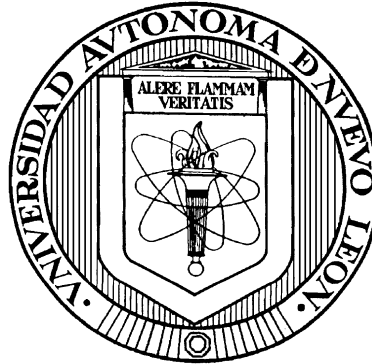


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**OSTEOGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* POR UN IMPLANTE DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMATOSAS TRANSDUCIDAS CON EL GEN
BMP-2 E INCLUIDAS EN UNA MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA**

Por

M. en C. Víctor Hugo Cervantes Kardasch

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Noviembre 2007

***“Cuando dejamos de jugar comenzamos a envejecer,
Cuando dejamos de soñar comenzamos a morir”***

Víctor Hugo Cervantes Kardasch

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber otorgado la beca de manutención número 158548 como parte de su Programa Nacional de Fortalecimiento a la Formación de Científicos y Tecnólogos de Alto Nivel

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) que financió el trabajo de esta tesis a través de su Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) con los proyectos SA 966-04 y SA 1176-05

A la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL por su programa de Doctorado en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética y su planta docente por todo el conocimiento y entrenamiento brindado.

Así mismo a los Departamentos de Bioquímica, Fisiología, Histología y Banco de Hueso y Tejidos de la misma Facultad por todas las facilidades, equipamiento y suministros que fueron necesarios para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES A:

Dios...

... por la vida y por las maravillas de su creación.

Mis padres, J. Saúl T. Cervantes y Flor de María Kardasch y a mis hermanos Saúl y Tzitzí Ileri...

... por su apoyo incondicional y siempre haber creído en mí.

Mi asesor Dr. Augusto Rojas Martínez...

... por su experiencia, su dirección y su paciencia.

Mi amigo y compañero de proyecto Dr. Yanko Castro Govea

Por su amistad y apoyo en momentos difíciles

Mis maestros Drs. Hugo Barrera, Herminia Martínez, Gerardo Padilla, Rocío Ortíz, Francisco Velázquez y Ana María Rivas...

...por sus conocimientos que tuvieron a bien compartir.

Los Profesores MVZ. Luís Vázquez, M.C. Víktor Romero y Dr. Eduardo Álvarez

... por su colaboración y soporte técnico

De manera especial a Jorge Lara, Christian Platas, Karina Trujillo, Angel Lugo, Iram Rodríguez y Alí Pérez...

... por la experiencia amistad y apoyos brindados

Compañeros de Terapia Génica Ivan, Daniel, Margarita, Laura, Valeria, Irma, Naika y Edith,...

... por ser compañeros de la misma aventura

Compañeros de postgrado Juan Chiu, Óscar, Iván, Berenice, Rafael, Mary Rocha, Carrillo, Jonathan, Cecilia, Juan Manuel, Olivia, Sofía, Luis Miguel, Clarita, Miguel.

... por estar ahí en el momento más adecuado

Personal del Depto. Bioquímica: Andrés, Alfredo, Denise, Lupita, Juani, Irasema, Lic Daniel, Lourdes Garza, Carmen(s), Lulú, Gerardo, etc.

Personal del Bioterio de Fisiología: Trino y Mario.

Personal de Histología: Lorenzo.

...por hacer más fáciles todas las cosas.

Y finalmente a Montserrat Salcido Garcés

... por ser mi musa

A todos GRACIAS

RESUMEN

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) son factores de crecimiento y transformación que promueven la osificación y la tipo 2 (BMP-2) está presente todo el proceso de diferenciación de las células madre mesenquimatosas (CMM) en osteocitos. El uso de BMPs en terapia génica ha sido exitoso en mamíferos pequeños, pero no así en mamíferos mayores. En el presente trabajo CMM caninas fueron transducidas *in vitro* con el vector adenoviral Ad-BMP-2 e incluidas en una matriz tridimensional para formar un implante de tres componentes (implante-3C). Se realizaron ensayos *in vitro* para comprobar la expresión de la BMP-2 humana y blancos transcripcionales de ésta. Los implantes-3C se cultivaron *in vitro* para evaluar el potencial osteogénico y cambios morfológicos. Para el modelo *in vivo* se usaron perros mongrel y se crearon implantes-3C de CMM autólogas para rellenar un defecto óseo creado para cirugías de distracción osteogénica mandibular. Se hizo un seguimiento radiográfico de la consolidación ósea de estas mandíbulas durante 10 semanas, al término de las cuales los perros fueron sacrificados y las mandíbulas se sometieron a análisis histológicos.

Los ensayos *in vitro* reportaron un incremento en la producción de fosfatasa alcalina (ALP), e incremento en la población celular y mineralización de la matriz extracelular. En los ensayos *in vivo*, el periodo de consolidación se redujo alrededor de la mitad de tiempo y mejoró la remodelación y la maduración de las estructuras histológicas óseas. No se observó reacción inflamatoria en el hueso neoformado.

Firma del Director

Tabla de contenido

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN	8
1.2 ANTECEDENTES	9
1.2.1 La regeneración ósea y las células madre mesenquimatosas	9
1.2.2 Las proteínas morfogenéticas de hueso	10
1.2.3 Vías de señalización de las BMPs.	11
1.2.4 Potencial osteogénico de las BMPs	14
1.2.5 Las BMPs en terapia génica	15
1.2.6 La matriz extracelular y la ingeniería de tejidos	16
1.2.7. La distracción osteogénica	16

CAPÍTULO II

2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos particulares.....	19

CAPÍTULO III

3.1 Estrategia general	21
------------------------------	----

CAPÍTULO IV

4. METODOLOGÍA	23
4.1 Vector Ad-BMP-2.....	23
4.2 Aislamiento de CMM y MHD	23
4.3 Modelo animal.	24
4.4 Actividad biológica de la BMP-2 humana (hBMP-2) en CMM caninas (estudios <i>in vitro</i>).	24
4.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantificación relativa (qRT-PCR).	25
4.4.2 Ensayos de Western blot	25
4.4.3 Regeneración ósea <i>in vitro</i>	26
4.5 Ensayos <i>in vivo</i>	27
4.5.1 Cirugía de distracción osteogénica.	27
4.5.2 Seguimiento postoperatorio.....	27
4.5.3 Estudios <i>post-mortem</i>	28

4.6 Análisis estadístico.	28
CAPÍTULO V	
5. RESULTADOS	30
5.1 Tipificación viral.....	30
5.2 Actividad biológica <i>in vitro</i> de la hBMP-2 transducida en CMM caninas.	31
5.3 Histología de los implantes cultivados <i>in vitro</i>	33
5.4 Ensayos <i>in vivo</i>	33
5.5 Ensayos de bioseguridad	37
CAPÍTULO VI	
6. DISCUSIÓN	39
CAPÍTULO VII	
7. CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44
ANEXOS	51
PROTOCOLOS.....	52
Extracción de DNA viral.....	53
Extracción y aislamiento de CMM caninas	55
Cultivo tridimensional de CMM en MHD	57
Construcción del implante-3C	59
Extracción de proteínas	61
Cuantificación de proteínas por microensayo de Bradford	63
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	65
qRT-PCR	69
SOLUCIONES.....	70
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas de las BMPs en el proceso de osificación.	13
Figura 2. Genoma esquemático un Ad-BMP-2 prototipo.	15
Figura 3. Estrategia general.....	21
Figura 4. Actividad biológica de la hBMP-2 en CMM caninas.....	32
Figura 5. Regeneración ósea <i>in vitro</i> 10 días post-transducción.	34
Figura 6. Ensayos <i>in vivo</i>	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Pruebas sanguíneas de toxicidad hepática.....	37
---	----

NOMENCLATURA

Ad-BMP-2	Vector adenoviral portador del gen BMP-2
Ad- β -gal	Vector adenoviral portador del gen de la beta-galactosidasa
ALB	Albúmina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BMP	Proteína morfogenética de hueso
Bmpr	Receptor extracelular para BMPs
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cm ³	Centímetros cúbicos
CMM	Células madre mesenquimatosas
Δ E1/E3	Genes deletados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1, E3	Genes adenovirales de expresión temprana
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidasa
GLOB	Globulina
h	Hora
Implante-3C	Implante de 3 componentes
kg	Kilogramo
LDH	Deshidrogenasa láctica
mg	Miligramo

µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Concentración mili Molar
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
n	Número de repeticiones
nM	Concentración nano Molar
PT	Tiempo de Protrombina
qRT-PCR	Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de lauril sulfato de sodio y-poliacrilamida
TB	Bilirrubina total
TGF-β	Superfamilia de factores de crecimiento y transformación beta

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La osteogénesis con fines de remodelación o reparación puede ser inducida en forma artificial, conocimiento que comenzó con la reducción de fracturas, primero de forma cerrada y posteriormente en forma abierta o quirúrgica; eventualmente se desarrollaron aparatos capaces de moldear y conducir el crecimiento óseo sometiendo al hueso a fuerzas de tensión como principio remodelador. Uno de los procedimientos más exitosos desarrollados es el de la distracción osteogénica, utilizado para incrementar la longitud de los huesos, forzándolos a repararse con una combinación de daño infligido (controlado) y aplicación de fuerzas tensionales. Existen padecimientos congénitos de acortamiento óseo craneofacial con hipoplasia mandibular, unilateral o bilateral, como el síndrome óculo-aurículo-vertebral, considerada la malformación congénita craneofacial más frecuente, después del labio paladar hendido. Los pacientes que padecen estos síndromes han encontrado en la distracción osteogénica una solución efectiva, funcional y estética; sin embargo este procedimiento sigue siendo prolongado y doloroso.

Por otro lado la osteogénesis también puede ser inducida molecularmente al administrar componentes que favorezcan la diferenciación de las células osteoprogenitoras, como los factores de crecimiento y los elementos propios de la matriz ósea o sustitutos de ésta, que como será analizado más adelante, poseen su propio potencial osteogénico con la posibilidad de actuar en sinergia al ser combinados.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 La regeneración ósea y las células madre mesenquimatosas

El hueso está constituido por un tipo especializado de tejido conjuntivo integrado en su mayor parte por matriz ósea compuesta por fibras de colágeno tipo 1 y 9 que constituyen el 95% de la matriz orgánica. La matriz inorgánica está formada en un 99% por depósitos de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita y otros depósitos amorfos. La mayoría de los tejidos al sanar crean una cicatriz fibrosa, sin embargo, el hueso es el único tejido capaz de regenerarse sin este tipo de cicatriz (Caetano-Lopes *et al*, 2007). Las células madre mesenquimatosas (CMM) representan un grupo de células progenitoras que residen en la médula ósea y se ha demostrado su capacidad de convertirse en células como miocitos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos y osteocitos (Rengachary, 2002 y Peister *et al*, 2004). El hueso recién formado comienza su mineralización en un promedio de 10 días, para ello las CMM son estimuladas principalmente por los osteoclastos, los cuales además de digerir el hueso viejo liberan al medio extracelular una serie de factores transformadores como las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la superfamilia de factores de crecimiento y transformación β (TGF- β). Dentro de los TGF- β hay una familia de factores bioactivos conocidas como

las proteínas morfogenéticas de hueso (Bone morphogenetic protein o BMP, en inglés) (Rengachary, 2002 y Zelzer y Olsen, 2003).

1.2.2 Las proteínas morfogenéticas de hueso

Las BMPs son las citocinas responsables de la osificación. La función primaria de las BMPs es la diferenciación de las CMM en osteoblastos y osteocitos, así como la calcificación de la matriz extracelular (Einhorn *et al*, 2003). Se han identificado y caracterizado alrededor de 20 diferentes formas de BMPs (Cao y Chen, 2005) y desde la década de los 90's se ha buscado una forma eficiente de utilizar su potencial osteogénico en la terapéutica (Okubo *et al*, 1999) (Partridge *et al*, 2002). Las BMPs 2, 4, 6 y 9 han demostrado mayor capacidad osteogénica (Cheng *et al*, 2003, Alden *et al*, 1999, Jane Jr *et al*, 2002 y Varady *et al*, 2001).

Las BMPs no se limitan al tejido óseo, sino que tienen un importante papel en el desarrollo embrionario de numerosos tejidos y órganos, incluyendo cartílago, epitelios, sistema nervioso central, corazón, hígado, gónadas y riñón (Einhorn *et al*, 2003).

La identificación, aislamiento y estudio de las BMPs se deben a Urist en la década de los 60 (Urist, 1965) y durante los 80's y 90's se han ido aislando y caracterizando una gran cantidad de ellas (Cao y Chen, 2005). Se ha descubierto que cada tipo participa en algún momento específico durante el proceso de diferenciación, desde la etapa de CMM hasta llegar al osteocito (Cheng *et al*, 2004). Las BMPs son glicoproteínas que contienen siete residuos de cisteína que son altamente conservados en todos los miembros de la superfamilia de los TGF- β (Urist *et al*, 1979). Por la homología en su secuencias

aminoacídicas las BMPs se han podido agrupar en tres subfamilias: la primera la constituyen las BMPs 2 y 4 con un 80-86% de homología, la segunda subfamilia la constituyen las BMPs 5, 6 y 7 con un 71-80% de similitud. La tercera subfamilia incluye solo a la BMP-3, debido a que esta es significativamente diferente al resto de las BMPs. La estructura tridimensional es muy similar entre la mayoría de las BMPs. Se cree que los huesos contienen 0.002 mg de BMPs por kilogramo de hueso pulverizado en condiciones normales y que esta cantidad se incrementa significativamente durante los procesos de reparación, pero la concentración requerida para ello se desconoce (Rengachary, 2002).

1.2.3 Vías de señalización de las BMPs.

Aun hay mucho que se desconoce respecto al modo como las BMPs desencadenan la actividad osteogénica. Actualmente se conocen varias vías a través de las cuales se activan blancos transcripcionales que a grandes rasgos se pueden clasificar en: a) aquellos encargados de la diferenciación celular, b) aquellos encargados de modificar la matriz extracelular y finalmente c) genes reguladores de la vía. Las BMPs requieren acoplarse extracelularmente a los receptores de BMP tipos I y II (Bmpr I y II) y este acoplamiento permite la fosforilación intracelular de las proteínas Smad, que son otra familia de proteínas TGF- β (Regazzoni *et al*, 2001). Todas las vías comienzan con la fosforilación de una Smad a través de Bmpr I y II. En la primera vía, Smad-1 fosforilada activa el homeodominio Hox. Se destaca la activación de Hoxc8, el cual se une a la Smad-1 fosforilada formando un heterodímero que activa al gen de la osteopontina. Paradójicamente, para la BMP-2 se ha descrito que Hoxc8

es capaz de bloquear la vía general cuando forma un heterodímero con Smad-6 y se une intracelularmente a Bmpr-I y-II bloqueando la fosforilación de otras Smads. Alternativamente las proteínas a fosforilar pueden ser las Smad 1, 5 y 8. Cualquiera de estas forma heterodímeros con Smad-4, que a su vez activa a Runx-2, a través de la cual se activan los genes COX-2, los colágenos tipo-1 y 10, la osteocalcina y la sialoproteína de hueso (Chen *et al*, 2004). En una vía adicional que es indirecta y de la cual no se conocen todos los componentes, el heterodímero formado por Smad 4 y las Smads 1, 5 u 8 activa a Wnt3a, el cual es translocado al espacio extracelular, donde activa a β -catenina por medio del receptor extracelular Frizzled y la participación de la proteína Dickkopf-1(Dkk1). La β -catenina constituye por si misma un paso importante en el proceso de osificación, ya que activará a la fosfatasa alcalina, cuya actividad es necesaria para la precipitación de las sales de hidroxiapatita, el componente mineral más importante del hueso (Dell'Accio *et al*, 2006). La Figura 1 ilustra las rutas metabólicas señaladas en este apartado. Recientemente se determinó que las BMPs son capaces de formar heterodímeros entre sus diferentes tipos. Aún se desconoce cuantas pueden hacerlo entre si, pero se cree que estos heterodímeros son capaces de activar vías alternas que completarían el esquema fisiológico de la osificación (Li *et al*, 2003).

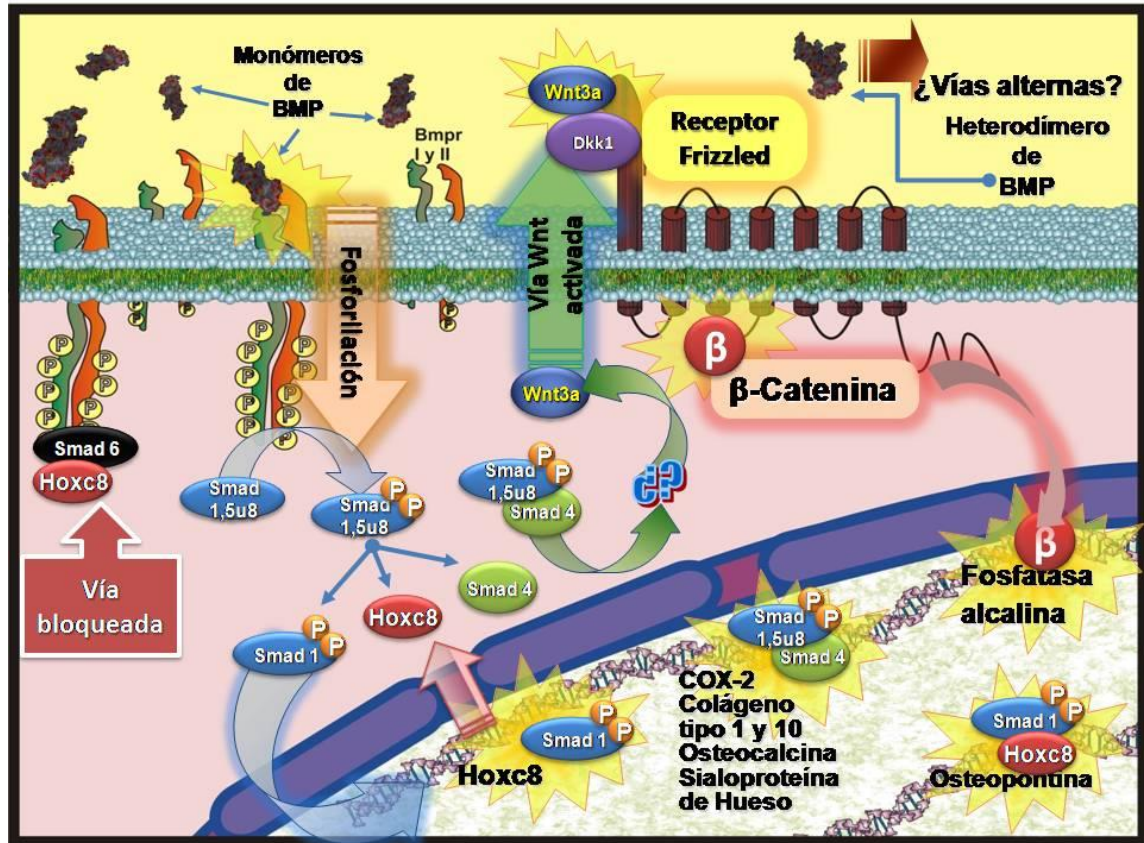


Figura 1. Rutas metabólicas de las BMPs en el proceso de osificación.

Las BMPs son citocinas que se liberan al medio extracelular. La activación de la ruta metabólica comienza con la unión de un monómero de BMP a los receptores transmembranales Bmpr tipos I y II, esta unión extracelular induce la fosforilación intracelular de las proteínas Smads tipos 1, 5 y 8, que les permite pasar a un estado activo. Las Smads activadas se dirigen hacia diferentes blancos transcripcionales: pueden actuar solas, como la Smad 1 que activa a Hoxc8 o formar heterodímeros. Por ejemplo, la misma Smad 1 se une a la proteína su propio blanco transcripcional Hoxc8 para activar al gen osteopontina. La gran parte de genes son activados a través de heterodímeros que forman la Smads 1, 5 u 8 con la Smad 4, ya sea directamente o a través de la vía Wnt (por un intermediario aún desconocido). En el caso de la BMP-2, la vía se bloquea cuando el heterodímero formado por Smad 6 y Hoxc8 se une a la porción intracelular de Bmpr I y II evitando la fosforilación de otras Smads. La capacidad de las BMPs de formar heterodímeros entre sus diferentes tipos probablemente permita la activación de rutas alternas (Kawabata, et al, 1998, Fujii et al, 1999, Regazzoni et al, 2001, Li et al, 2003, Chen 2004, Cao y Chen 2005, Varga y Wrana, 2005 y Dell'Accio et al, 2006).

1.2.4 Potencial osteogénico de las BMPs

Desde el descubrimiento de las BMPs se han explorado sus posibilidades terapéuticas. Los primeros ensayos consistieron en colocar el extracto de BMP humana dentro de una doble cobertura de acetato de celulosa en la pared abdominal de conejos, obteniéndose osteogénesis *in situ*; para entonces ya se había determinado que las BMPs no tienen actividad específica de especie (Takahashi y Urist 1986). A lo largo de tres décadas se ha ido determinando el potencial osteogénico de cada BMP de manera individual, el cual en la mayoría de los tipos es capaz de inducir la formación de hueso ectópico. El más importante de estos estudios fue el desarrollado por He *et al.* (2003).

Las BMPs mantienen una versatilidad tal, que son capaces de osteoconducir prácticamente a cualquier línea celular que se encuentre dentro del rango mesenquimal. Además, en el adulto la actividad de las BMPs es localizada, lo cual las hace muy seguras de utilizar. Por lo anterior la Asociación de Alimentos y Medicinas de Estados Unidos (FDA, en inglés) ha autorizado el uso de las BMPs 2 y 7 para su uso en ensayos clínicos y varias más se encuentran en evaluación. Sin embargo las BMPs presentan el problema de tener una vida media muy corta (de pocas de horas) y para lograr una neoformación ósea exitosa se requieren algunas semanas de exposición; inclusive en ensayos *in vitro* los primeros indicios de osificación aparecen alrededor del décimo día. Esto hizo que se pensara en formas de mantener este estímulo por periodos más prolongados (Govender *et al.*, 2002 y Valentin-Opran *et al.*, 2002).

1.2.5 Las BMPs en terapia génica

La necesidad de mantener el estímulo de BMPs por arriba de los 10 días llevó a pensar en la terapia génica, ya que una expresión transitoria aseguraría un estímulo sostenido de BMPs durante el tiempo necesario para lograr la osificación (Okubo *et al.*, 2000). Se han probado diferentes tipos de vectores como liposomas, vectores adenovirales y vectores adenoasociados. Los vectores adenovirales no replicativos son actualmente los más usados porque poseen los mejores índices de transducción, en su mayoría basados en el adenovirus 5, que para este fin son contruidos con deleciones parciales de los genes E1A, E1B y E3 (Figura 2)

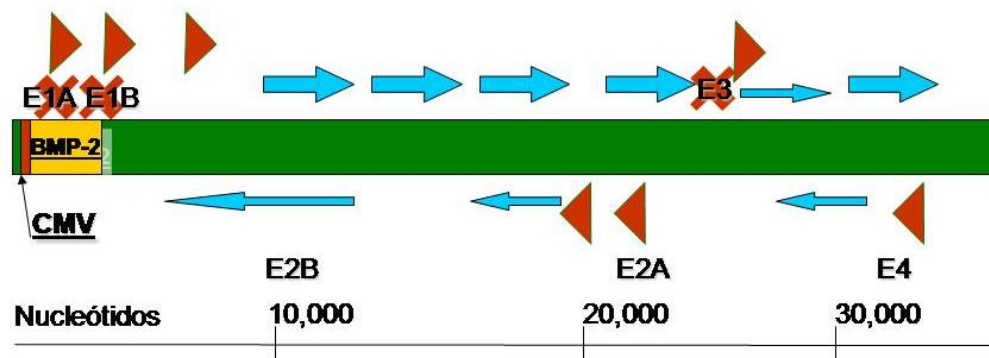


Figura 2. Genoma esquemático un Ad-BMP-2 prototipo.

Este esquema se basa en el Ad-BMP-2 publicado por Betz, *et al.* (2005). Tiene deleciones en los genes E1A, E1B, espacio en el cual se colocó la secuencia codificante del gen BMP-2 y la secuencia promotora del citomegalovirus (CMV). El gen E3 también se encuentra deletado para facilitar el empaquetamiento.

La terapia adenoviral se ha usado tanto *in vivo* (Baltzer *et al.*, 2000) como *ex vivo* (Chang *et al.*, 2003) y estas se han probado con éxito en mamíferos pequeños. Sin embargo la terapia *in vivo* en mamíferos grandes hasta el momento ha sido infructuosa, ya que la respuesta inmune que despiertan los

adenovirus inhibe la osificación prácticamente en su totalidad (Blair, 2004 y Egermann *et al.*, 2006 a). La terapia *ex vivo*, que en teoría limitaría esta respuesta, no ha sido probada en mamíferos mayores.

1.2.6 La matriz extracelular y la ingeniería de tejidos

A la posibilidad de utilizar células y/o materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción de órganos y tejidos se le conoce como Ingeniería de Tejidos (Orefo *et al.*, 2005). En el caso del tejido óseo, un andamiaje tridimensional de soporte CMM en el ambiente extracelular facilita la diferenciación ósea (Geiger *et al.*, 2003, Hishikawa *et al.*, 2004 y Gaissmaier *et al.*, 2005). En la actualidad se usan polímeros, cerámicas, y extractos parciales o totales de matriz ósea que podrían favorecer la liberación de factores transformadores (Helm *et al.*, 2001 y Köse *et al.*, 2005). De estos, los materiales derivados de hueso llegan a ser los de mayor utilidad, ya que cuentan con una pequeña fracción intrínseca de BMPs (Peterson *et al.*, 2004 y Louis-Ugbo *et al.*, 2005).

1.2.7. La distracción osteogénica

Tanto para la terapia génica, como para la ingeniería de tejidos, se han utilizado diferentes modelos pre-clínicos en animales buscando diferentes objetivos terapéuticos; la distracción osteogénica es uno de ellos. La distracción osteogénica es el procedimiento quirúrgico para elongar cualquier tipo de hueso que fue popularizado por Ilizarov y Berko (1980). La cirugía consiste en una corticotomía ósea (obteniendo dos segmentos óseos vascularizados) y la fijación de los extremos resultantes por un aparato distractor (los hay de muchos tipos) que dará soporte al hueso al tiempo que permite la separación de

los segmentos. El aporte vascular es preservado al mantenerse la continuidad del periostio alrededor del sitio de la osteotomía. La distracción osteogénica consta de 3 periodos: la latencia es el tiempo entre el acto quirúrgico y el inicio de la distracción y puede ir de 0 hasta 7 días; la distracción o elongación es en términos generales de 1 mm por día hasta obtener la distancia requerida. Una vez que ha concluido la elongación se pasa por un periodo de consolidación en el cual el nuevo hueso madura, esta etapa es la más prolongada de todas y puede ir entre 12 y 16 semanas en la mandíbula. La distracción mandibular se usa en la actualidad para tratar a niños con anomalías craneofaciales congénitas como el síndrome óculo-aurículo-vertebral (Cope *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se desarrolló un implante de 3 componentes (implante-3C) compuesto por vectores adenovirales no replicantes portadores del gen humano BMP2 para terapia *ex vivo*, células madre mesenquimatosas (CMM) y matriz de hueso desmineralizado (DBM), que combinó la terapia génica *ex vivo* y la ingeniería de tejidos y se eligió el modelo de distracción mandibular para reducir el periodo de consolidación en un modelo canino de distracción osteogénica.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Valorar el potencial y la seguridad del implante -3C, constituido por CMM transducidas con el vector Ad-BMP2 y embebidas en matriz ósea desmineralizada para desarrollar modelos pre-clínicos de osificación *in vitro* e *in vivo*, usando vectores adenovirales de terapia génica no replicantes.

2.2 Objetivos particulares

2.2.1. Identificar y evaluar los cambios morfofuncionales inducidos por el implante -3C *in vitro*.

2.2.2. Comparar la osificación mediada por el implante-3C en un modelo canino sometido a distracción osteogénica del maxilar inferior con el proceso de osificación que ocurre en la distracción ósea simple y en la distracción ósea asistida con CMM.

2.2.3. Evaluar la seguridad del tratamiento con el implante-3C en el modelo canino por medio de parámetros hematológicos y de química sanguínea.

CAPÍTULO III

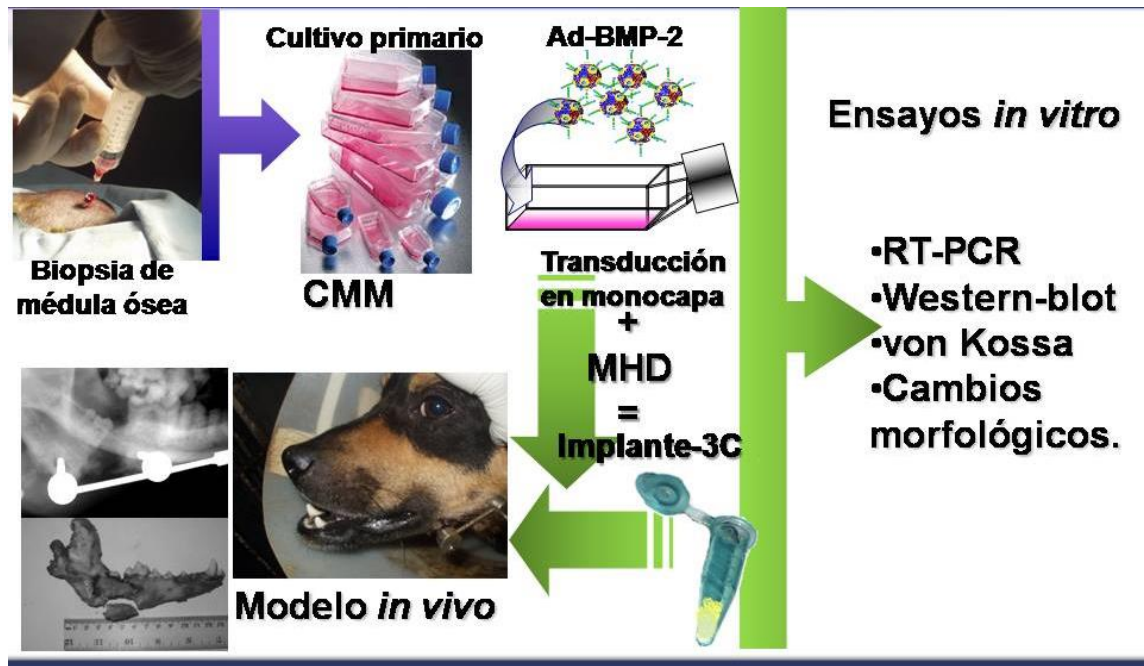


Figura 3. Estrategia general

CAPÍTULO IV

4. METODOLOGÍA

4.1 Vector Ad-BMP-2

Este vector fue amablemente proveído por el Dr. Christopher Evans del Molecular Orthopedics Harvard Medical School de Boston, Massachusetts. Este es un adenovirus tipo 5 Δ E1/E3 que contiene la secuencia promotora del citomegalovirus y que controla la expresión de la secuencia codificante de la BMP-2 humana (Betz *et al.*, 2006). El vector fue producido a gran escala infectando células HEK-293 y fueron purificados en gradiente de CsCl para eliminación de las sales por medio de diálisis, la titulación se hizo en partículas virales leyendo la absorbancia a 260 nm. Para caracterizar al vector se amplificó una región quimérica del promotor de CMV y el transgen de la BMP2 humana con iniciadores específicos 5'-CGTTACATAACTTACGGTAAATGGC-3' (sentido) y 5'-CTAGCGACACCCACAACCC-3' (antisentido), posteriormente se clonó el amplicón en el vector T TOPO TA (Invitrogen) el cual se mandó a secuenciar usando los iniciadores M13. La secuencia obtenida fue cotejada en el *Gene Bank* disponible en la red mundial.

4.2 Aislamiento de CMM y MHD

Las CMM autólogas fueron aisladas a partir de biopsias de las epífisis humerales de los perros bajo sedación y anestesia local. Las biopsias fueron fragmentadas y digeridas progresivamente con tripsina al 0.25% y colagenasa grado II a una concentración de 1 mg/ml. Las CMM fueron recuperadas por centrifugación y separadas por adherencia en frascos de cultivo en medio mínimo modificado de Dubelcco (Dulbecco's modified Eagle's medium o

DMEM) con 20% de suero bovino fetal, 0.1% de gentamicina, 1% de amfotericina B, 1% de ampicilina/kanamicina y β -glicerolfosfato a una concentración de 20 mM como fuente de sales minerales. El medio fue cambiado cada 24 h hasta alcanzar confluencia de 70% (alrededor de 7–10 días). Cuando fue necesario, se realizaron hasta dos pasajes para obtener alrededor de 1.5×10^7 células en total. La MHD fue procesada y liofilizada en el Banco de Hueso del Hospital Universitario, UANL.

4.3 Modelo animal.

Se utilizaron perros mongrel sanos de 20-25 kg de peso proveídos por el Centro Antirrábico Municipal. Estos recibieron los cuidados veterinarios y estuvieron confinados en el bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UANL, según la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Aquí fueron nutridos durante las dos semanas previas al acto quirúrgico.

4.4 Actividad biológica de la BMP-2 humana (hBMP-2) en CMM caninas (estudios *in vitro*).

Las CMM (1×10^5 células) fueron transducidas durante toda la noche con el Ad-BMP-2 a 1×10^3 - 1×10^5 multiplicidades de infección (MOI) en placas de 96 pozos. El medio fue reemplazado completamente postransducción y cada 24h, mientras duró el experimento. Como control negativo se usaron células no transducidas y transducidas con el vector Ad- β -galactosidasa (Ad- β -gal). Como control positivo se usaron células no transducidas a las que se les añadió dexametasona 1 nM. Las pruebas de actividad biológica incluyeron la cuantificación relativa de la transcripción del mRNA de fosfatasa alcalina (ALP)

mRNA y la expresión proteica del colágeno tipo 1 canino. Los experimentos fueron observados a las 24, 48 y 96 h postransducción.

4.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantificación relativa (qRT-PCR).

Se utilizó la técnica de qRT-PCR para cuantificar la producción de mRNA de ALP. Para esto el RNA fue aislado a las 24, 48 y 96 h postransducción utilizando el kit de extracción Versagene kit (Gentra Systems Inc. Minneapolis, MN) y el cDNA fue sintetizado con el kit de retrotranscripción Superscript Platinum con SYBRGreen (Invitrogen, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de mRNA de ALP se utilizaron los cebadores específicos 5'-TGGAACCGCACGGAAGTC-3' (sentido) y 5'-GCTCAAAAGAGACCCAAGAGGTAGT-3' (anti sentido). Para normalizar los resultados se cuantificó la expresión del mRNA de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando los cebadores 5'-ATGGAAATCCCATCACCA TCTT3' (sentido) y 5'-CGCCCCACATTGATTTTGG- 3' (anti sentido). La qRT-PCR fue desarrollada en un equipo ABI-7000 (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA).

4.4.2 Ensayos de Western blot.

La presencia de las proteínas hBMP-2 y el colágeno tipo 1 canino fueron detectados por análisis de Western blot. Se usaron 80 µg de proteínas totales, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez transferida la membrana, se bloqueó con buffer de fosfatos (PBS) y con leche descremada al

5%. Para detectar la hBMP-2 y el colágeno tipo 1 canino se utilizaron respectivamente los anticuerpos primarios IgG policlonal de cabra anti-BMP-2 humana (dilución 1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) e IgG monoclonal de ratón anti-COL1 canina (dilución 1:100) (Abcam PLC, Cambridge, UK). Como control se utilizó hBMP-2 comercial (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La reacción antígeno-anticuerpo se detectó con PBS con leche descremada al 5%, con peroxidasa de rábano y con los anticuerpos conjugados IgG de pollo anti-cabra e IgG de cabra anti-ratón, dirigidos contra los anticuerpos humano (por reacción cruzada contra el anticuerpo de cabra) y contra ratón, respectivamente. Los ensayos fueron revelados con diaminobencidina.

4.4.3 Regeneración ósea *in vitro*.

Para estos experimentos se usaron los mismos grupos experimentales que se mencionaron arriba. Las CMM se recuperaron tras una noche postransducción; estas se lavaron en 3 ocasiones en PBS y fueron embebidas en MHD e incubadas en placa de 96 pozos por 10 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 24 h y al término de los 10 días los implantes fueron incluidos en medio de congelación Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA) para realizar criocortes. Para los estudios de microscopía los criocortes se tiñeron con las técnicas de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Gomori y von Kossa para evaluar los patrones histológicos de la matriz de colágeno y calcificación ósea *in vitro*.

4.5 Ensayos *in vivo*.

Para crear los implantes 3C se cultivaron 1.5×10^7 CMM caninas y fueron transducidas durante toda la noche a una MOI de 1×10^4 . A la siguiente mañana las células fueron lavadas con PBS en 3 ocasiones para lavar el excedente de vectores. Las CMM modificadas fueron recuperadas con tripsina al 0.25% y suspendidas en 250 μ l de DMEM libre de suero. La suspensión de células se usó para reconstituir 0.25 cm³ de polvo de MHD. El implante control se construyó utilizando CMM no transducidas usando el mismo protocolo.

Los perros se distribuyeron en 3 grupos experimentales (n = 3 por grupo). Dos grupos recibieron implantes (implante-3C para el grupo I e implante control con solo CMM para el grupo II) y el último grupo no recibió implante alguno (grupo III).

4.5.1 Cirugía de distracción osteogénica.

La cirugía de distracción osteogénica se realizó bajo anestesia general con ketamina–pentobarbital. Los bordes de la osteotomía en la mandíbula fueron fijados con un aparato distractor externo tipo Fuente del Campo. El implante fue colocado en el área creada por la osteotomía y fue recubierto con el periostio. La distracción se realizó durante 10 días a razón de 1 mm por día.

4.5.2 Seguimiento postoperatorio.

Se realizaron pruebas de función hepática el día previo a la cirugía y dos semanas después del evento quirúrgico. Estos incluyeron tiempo de protrombina (PT) y las concentraciones de albúmina (ALB), globulina (GLOB), bilirrubina total (TB), aspartato aminotransferasa (AST), alanina

aminotransferasa (ALT), ALP, deshidrogenasa láctica (LDH) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT). Se realizó seguimiento radiográfico cada dos semanas durante 10 semanas, una vez terminado el periodo de distracción de 10 días.

4.5.3 Estudios *post-mortem*.

En la décima semana postdistracción los perros fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital y KCl vía intravenosa. Las áreas de hueso tratado fueron recuperadas, fijadas con formaldehído por 5 días y desmineralizado con HCl al 5% durante 10 días. Los bloques de hueso desmineralizado fueron incluidos en parafina y los microcortes fueron teñidos con las técnicas de H&E y tricrómico de Masson para estudiar la arquitectura de la neoformación ósea y datos de inflamación.

4.6 Análisis estadístico.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados en el paquete de estadística SPSS v 13.0 (SPSS-UK Ltd, St. Andrews House, UK). Se realizaron pruebas de Student pareada y ANOVA de una vía con análisis de Dunnet. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ para considerar significancia. Los datos se representaron como media \pm desviación estándar para replicas independientes.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS

5.1 Tipificación viral

La región quimérica amplificada fue de 1.8 Kb y fue clonada exitosamente. El análisis hecho en el *Gene Bank* mostró homología hacia el promotor de citomegalovirus (CMV) y hacia la BMP2 humana como se muestra a continuación:

gi|59800|emb|X03922.1|HEHCMVP1 Human cytomegalovirus (HCMV) IE1 gene promoter region.

Score = 476 bits (240), Expect = 2e-131
Identities = 240/240 (100%), Gaps = 0/240 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query  2      CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATT  61
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  620     CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATT  679

Query  62      GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA  121
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  680     GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA  739

Query  122     ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC  181
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  740     ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC  799

Query  182     AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA  241
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  800     AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA  859

```

qi|46812656|qb|BC069214.1|Homo sapiens bone morphogenetic protein 2,

mRNA (cDNA clone IMAGE:6303163), partial cds

Score = 628 bits (317), Expect = 3e-177				
Identities = 335/341 (98%), Gaps = 0/341 (0%)				
Strand=Plus/Minus				
Query	1	CTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCCTTTAATACAACCTTTTCATTCTCGTCAAGGAACAG	60	
Sbjct	1958	CTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCCTTTAATACAACCTTTTCATTCTCGTCAAGGTACAG	1899	
Query	61	CATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAAC	120	
Sbjct	1898	CATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAAC	1839	
Query	121	AGAGTTGACCAACGCTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAGAGG	180	
Sbjct	1838	AGAGTTGACCAACGCTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAGAGG	1779	
Query	181	AAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGGGGAGCCACAATCCAGTC	240	
Sbjct	1778	AAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGGGGAGCCACAATCCAGTC	1719	
Query	241	ATTCTTTCCACGTCACCTGAAGTCCACGTACAAAAGGTGTCTCTTACAGCTGGACTTAAG	300	
Sbjct	1718	ATTCCACCCACGTCACCTGAAGTCCACGTACAAAAGGTGTCTCTTACAGCTGGACTTAAG	1659	
Query	301	GCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTT	341	
Sbjct	1658	GCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTT	1618	

5. 2 Actividad biológica *in vitro* de la hBMP-2 transducida en CMM caninas.

La expresión de ALP se incrementó tanto en las CMM transducidas con Ad-BMP-2 y las CMM estimuladas con dexametasona (control positivo). En todos los casos el pico máximo de expresión apareció a las 48 h (Figura 4A). En el caso de las CMM transducidas con Ad-BMP-2 a 1×10^4 MOI, la expresión de ALP fue 44% más elevada que el control positivo ($P < 0.001$), por otro lado, las CMM transducidas con el vector Ad- β -gal no cambió en ningún caso los niveles de expresión respecto de la expresión basal. El análisis de Western blot corroboró la expresión de la hBMP-2 restringida a las CMM transducidas con el

Ad-BMP-2 y con la proteína recombinante control (Figura 4B). En el caso de la expresión de colágeno tipo 1 canino no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4C).

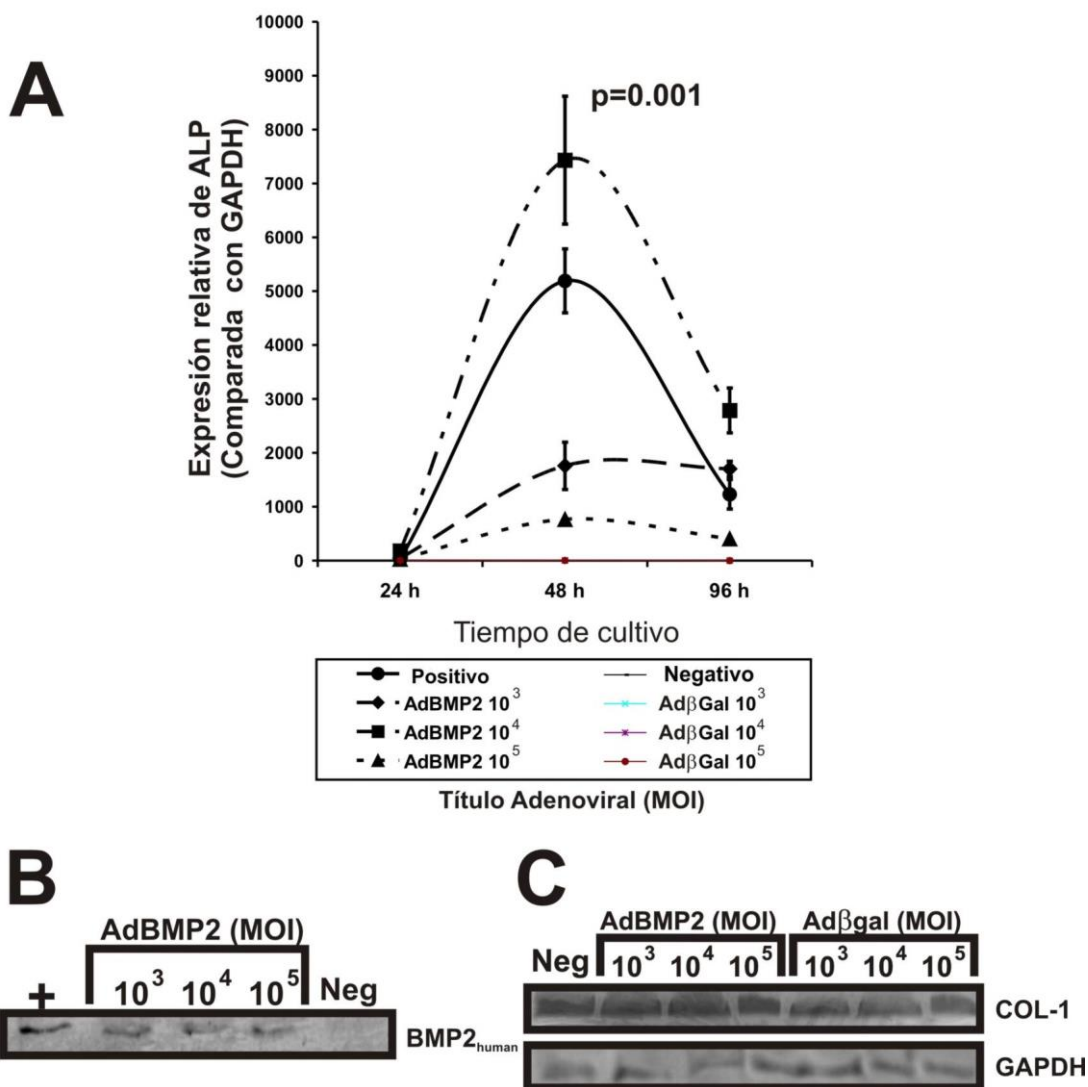


Figura 4. Actividad biológica de la hBMP-2 en CMM caninas

A. La actividad transcripcional del gen ALP (un blanco de la BMP2) en CMM en cultivo muestra un pico a las 48 h post-transducción con diferentes dosis del vector Ad-BMP-2. La transducción con una MOI = 1×10^4 fue la que mostró la actividad más alta y fue significativamente más elevada que el control positivo ($p = 0.001$). B. El Western blot, realizado 96 h postransducción para detección BMP2 humana, demostró la presencia de esta proteína en las células caninas transducidas con el Ad-BMP-2, sin diferencia significativa con control positivo C. El Western blot para el colágeno tipo 1 canino sugiere un pequeño incremento en la producción de la proteína en CMM transducidas cuando se compara con el control de GAPDH.

5.3 Histología de los implantes cultivados *in vitro*.

La tinción H&E reveló un incremento significativo ($P < 0.01$) en la población de las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 (539 ± 27 células/campo) y en el control positivo (102 ± 13 células/campo), respecto a los controles negativos; es decir, las CMM transducidas con el Ad- β -gal y las CMM no transducidas (45 ± 12 y 44 ± 8 células/campo respectivamente). La distribución de la matriz de colágeno tipo 1 (tinción tricrómica de Gomori) no varió entre los diferentes tratamientos. Un hallazgo importante fue el grado de mineralización de la matriz extracelular (tinción de von Kossa), el cual fue más evidente en las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 y en el control positivo. Como es sabido para esta tinción, entre más oscura, es mayor la concentración de sales de calcio insolubles (Figura 5).

5.4 Ensayos *in vivo*.

El seguimiento radiográfico demostró la completa consolidación de las mandíbulas tratadas con el implante-3C alrededor de la sexta semana de consolidación, mientras que las mandíbulas de los otros dos grupos presentaba solo consolidación parcial para la octava semana. Estos resultados indican que la consolidación para las mandíbulas tratadas con el implante-3C ocurre aproximadamente en la mitad del tiempo (Figura 6A).

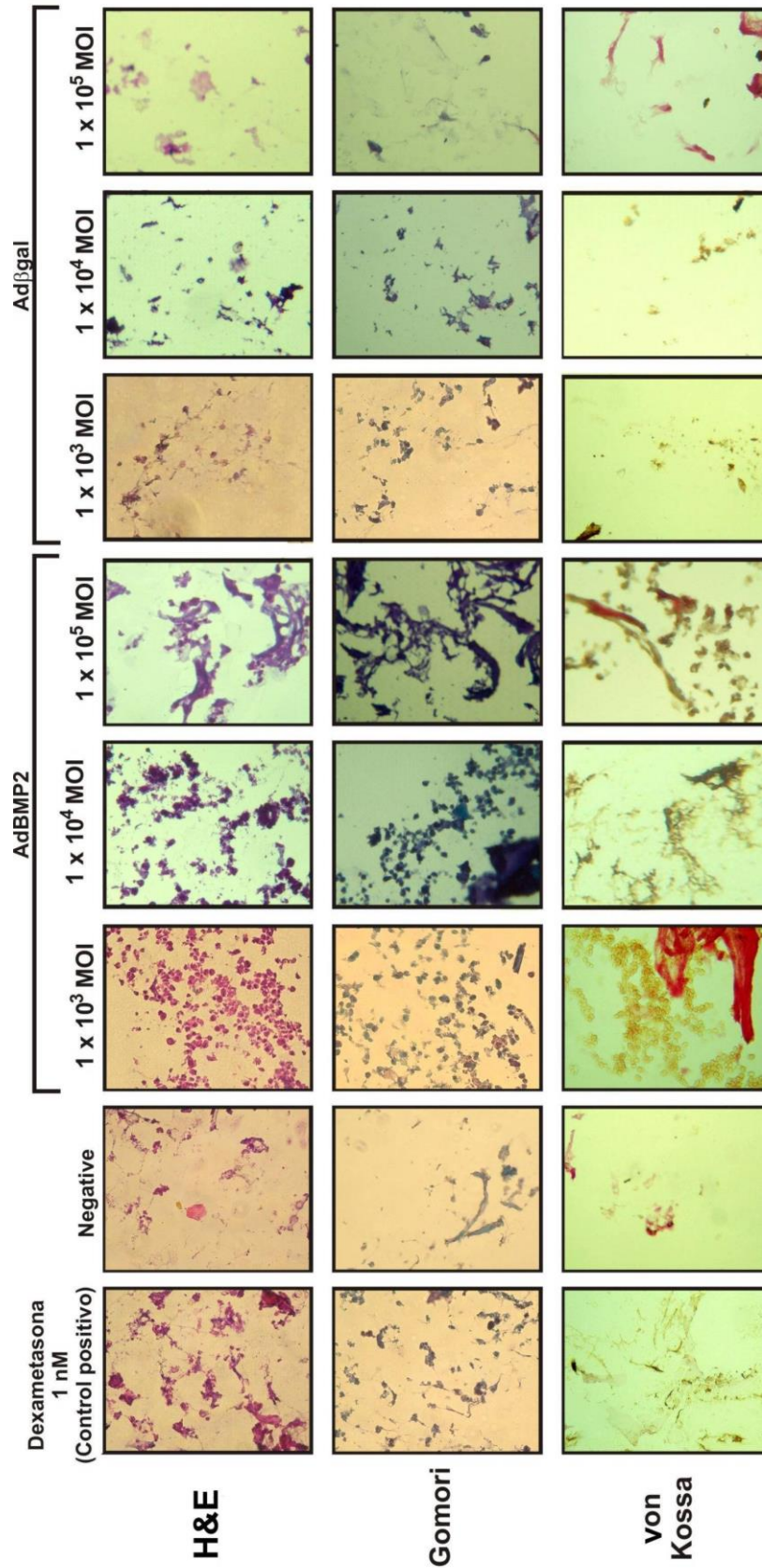


Figura 5. Regeneración ósea *in vitro* 10 días post-transducción.

Las tinciones H&E y Gomori muestran la integración de las CMM dentro de la matriz de la MHD. Existe producción de colágeno nuevo en todos los casos con un remarcado aumento en la población celular en los cultivos de los implantes-3C. La tinción de von Kossa demostró un incremento en la calcificación para los implantes transducidos con el vector Ad-BMP-2 (las áreas café revelan los depósitos de calcio). Todas las microfotografías están a un tamaño 150X.

El análisis macroscópico *post-mortem* de las mandíbulas que recibieron el implante-3C obtenidas a las 10 semanas postdistracción mostró en el área de la distracción un hueso con aspecto y dureza casi normal y el tejido fibrótico adherido fue fácilmente removido. Las mandíbulas que recibieron el implante de CMM no transducidas presentaban un callo fibrótico muy grueso y adherido a la zona tratada (dicho callo se manifestó visualmente como tumoraciones durante la evolución postquirúrgica). Por su parte las mandíbulas que no recibieron implante mostraron una consolidación evidentemente incompleta, el callo fibrótico en estos casos fue pequeño y contraído, como corresponde a una evolución normal en este tipo de procedimientos (Figura 6B).

El análisis de la tinción de H&E para las áreas regeneradas mostró una completa reconstitución de hueso maduro para las mandíbulas tratadas con el implante-3C. El tejido neoformado incluyó periostio, hueso laminar y hueso esponjoso. En las mandíbulas que recibieron el implante con CMM no transducidas se observaron extensas áreas de tejido fibrótico, además de abundantes núcleos dispersos de actividad osteoblástica. Finalmente las mandíbulas que no recibieron implante mostraron lesiones regenerativas caracterizadas por extensas áreas de actividad osteoblástica y pocas zonas de hueso trabecular. La tinción tricrómica de Masson confirmó la presencia de hueso trabecular y medula ósea en el hueso neoformado en aquellas mandíbulas que recibieron el implante-3C, áreas de actividad osteoblástica difusa en los que no recibieron implante y núcleos de neoformación ósea en las mandíbulas tratadas con el implante de CMM sin transducción (Figura 6C).

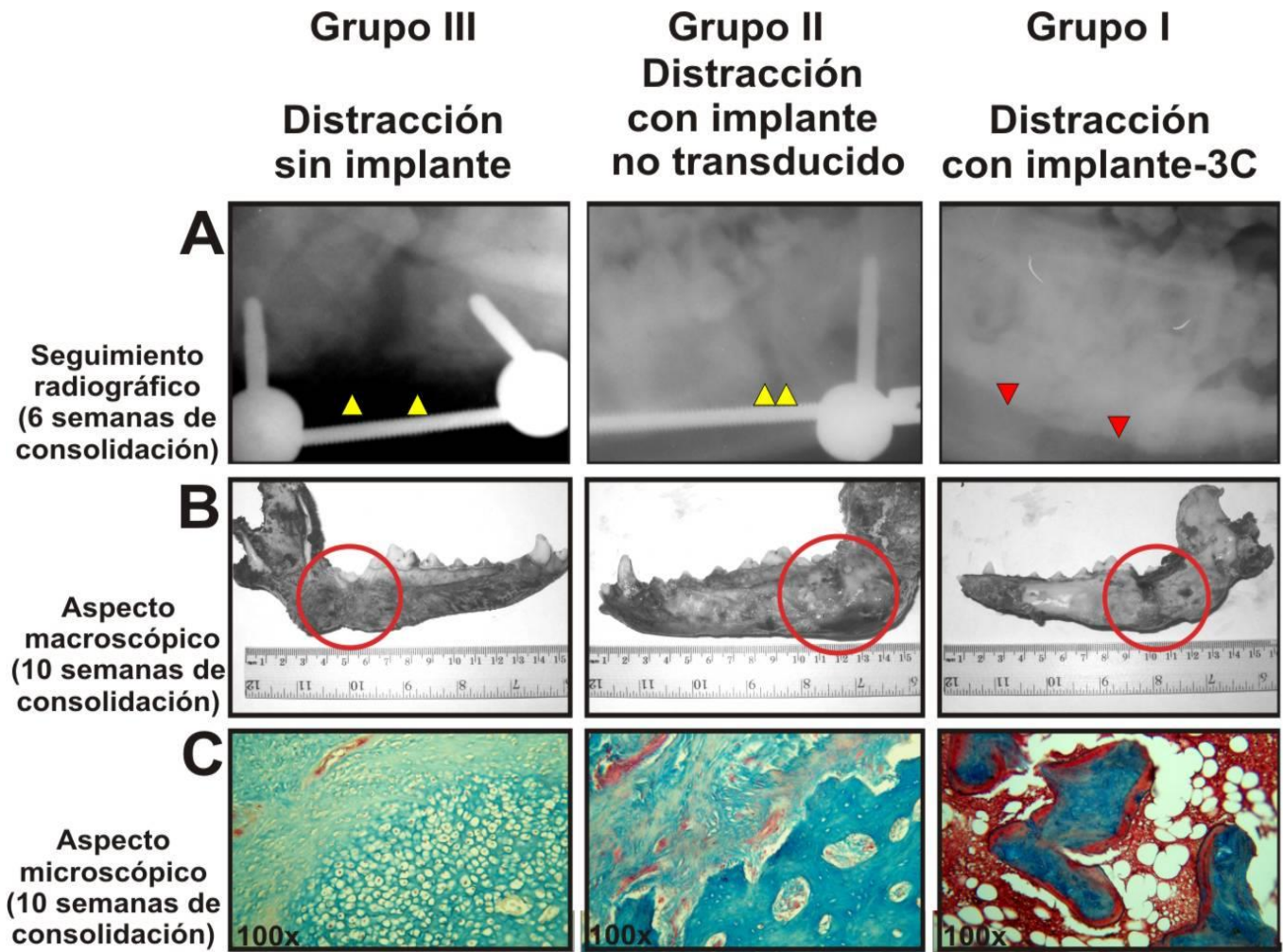


Figura 6. Ensayos *in vivo*.

A. Seguimiento radiográfico a las 6 semanas de consolidación. Los triángulos amarillos marcan el progreso de la consolidación en las mandíbulas control, mientras que los triángulos rojos muestran los bordes de la osteotomía en la mandíbula con implante-3C. B. Macroscopía *post-mortem* (áreas de distracción circuladas en rojo). La mandíbula sin distracción muestran una contracción normal del tejido con una marcada escotadura, la mandíbula con implante de CMM no transducidas desarrolló abundante fibrosis y el hueso que recibió el implante-3C aparece completamente osificado y sin fibrosis. C. Microfotografías del hueso neoformado (tinción tricrómica de Masson). Las mandíbulas sin implante muestran amplias zonas inmaduras con actividad osteoblástica, las mandíbulas con el implante de CMM no transducidas evidenciaron abundante tejido fibrótico intercalado con hueso maduro y núcleos de osificación. El implante-3C demostró mejorar la osificación y maduración hacia diferentes estructuras (hueso trabecular y esponjoso), así como presentar mucho menos fibrosis. No hay evidencia de infiltrado inflamatorio en el hueso tratado con el implante-3C.

5.5 Ensayos de bioseguridad

Los análisis sanguíneos no mostraron signos de toxicidad hepática o sistémica en todos los grupos tratados durante el estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas sanguíneas de toxicidad hepática

<i>Prueba</i>	<i>preoperatorio</i>	<i>2 semanas postoperatorio</i>
PT (g/dl)	6.63 ± 0.5	6.166 ± 0.23
ALB (g/dl)	2.83 ± 0.57	2.533 ± 0.32
GLOB (g/dl)	3.8 ± 0.55	3.633 ± 0.32
TB (mg/dl)	0.099	0.099
AST (UI/L)	33 ± 12.52	24 ± 4.35
ALT (UI/L)	58.33 ± 31.89	43.33 ± 35.72
ALP (UI/L)	60.66 ± 13.27	67.33 ± 38.03
LDH (UI/L)	419.33 ± 40.96	298.66 ± 84
GGT (UI/L)	4.9 ± 3.1	0.1

PT, tiempo de protrombina; ALB, albumina; GLOB, globulina; TB, bilirrubinas totales; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa; ALP, fosfatasa alcalina; LDH, deshidrogenasa láctica; GGT, gamma-glutamyl transpeptidasa.

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

Las BMPs, particularmente las 2 y la 7, las matrices de biomateriales y las CMM han sido probadas por separado o en combinación para su uso en regeneración ósea, fusión vertebral y procedimientos de distracción osteogénica en diferentes modelos con resultados muy variables (Orefo *et al.*, 2005). Actualmente las proteínas recombinantes humanas BMP 2 y 7 se encuentran aprobadas por la FDA para ciertos usos clínicos (Govender *et al.*, 2002) (Valentin-Opran *et al.*, 2002), pero la vida media tan corta que poseen limita su uso en reparación ósea. La transferencia del gen BMP-2, particularmente con vectores adenovirales no replicantes, puede sostener la producción de hueso por 4 a 6 semanas. El estímulo regenerador posterior a la transferencia génica de BMP-2 ha sido demostrado ampliamente en roedores, pero las pruebas en mamíferos mayores como perros u ovejas sigue representando un reto para probar la eficacia de está, antes de|| poder proseguir a los ensayos clínicos de terapia génica. Reportes preliminares en estos modelos no son favorables para el uso de vectores adenovirales. El factor crítico a considerar es la vía de administración del vector, pues la respuesta inmune que despierta el vector puede afectar considerablemente y hasta inhibir el efecto osteogénico (Egermann *et al.*, 2006 b).

En nuestros experimentos *in Vitro*, las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 a 1×10^4 MOI mostraron el mayor nivel de transcripción de ALP (un blanco transcripcional de la actividad metabólica de la BMP-2) a las 48 h

postransducción, mientras que la expresión de colágeno tipo 1 no se ve afectada a las 96 h postransducción. Además observamos un notable aumento en la población en aquellos cultivos tridimensionales de CMM transducidas con el Ad-BMP-2, que a su vez se acompañó por un incremento en la mineralización de la matriz extracelular. Estos resultados sugieren que la actividad osteogénica se pone de manifiesto antes de los 10 días postransducción y esto es consistente con la observación de reportes previos (Hishikawa *et al.*, 2004, Luu *et al.*, 2007 y Zachos *et al.*, 2007).

Si consideramos el posible efecto inductivo de la MHD, esperamos que la incorporación de ésta en el implante, favorezca la regeneración ósea de las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 en un modelo de mamífero mayor, ya que otros materiales inertes como el alginato, que no favorecen y hasta contrarrestan el efecto osteoinductor, han sido utilizados para ser implantados con resultados poco satisfactorios (Zachos *et al.*, 2007). El seguimiento radiográfico mostró que el implante-3C utilizado en distracciones mandibulares reduce la consolidación aproximadamente en la mitad del tiempo en relación al periodo normal. A las 10 semanas, cuando el experimento fue concluido, encontramos que el hueso reconstruido por el implante-3C posee características macroscópicas y microscópicas de hueso maduro normal. Estos resultados no fueron superados por las mandíbulas que recibieron el implante con CMM sin transducción o en las que no recibieron implante alguno en el mismo periodo de tiempo. Por otro lado, la extensa fibrosis producida por el implante de CMM y MHD demuestra que aunque existe osteoinducción, esta fibrosis es contraproducente y hace evidente la indispensable participación de la

hBMP2 para conducir la remodelación. Considerando los datos de expresión, es muy posible que la colocación del implante genéticamente modificado inmediatamente después de su fabricación, en lugar de cultivarlo antes de su implantación, facilite la activación sincronizada de los mecanismos requeridos para iniciar la actividad osteogénica.

Muchos otros factores explorados en nuestro modelo canino proveen argumentos a favor del uso del implante-3C en mamíferos mayores. Este modelo utiliza animales inmunocompetentes con amplia heterogeneidad genética y sin crianza especial para laboratorio, lo cual supone siempre un reto a vencer para los modelos de investigación preclínica. También es importante mencionar que el área tratada está sujeta constantemente a fuerzas y tensiones propias de un animal carnívoro y que al ser la primera porción del aparato digestivo es una zona con una gran actividad inmunológica.

Histológicamente no encontramos evidencia de una reacción inflamatoria persistente o actividad linfocítica en la zona de implantación. La hipótesis a este respecto es que la baja respuesta inmune en nuestro modelo se debe tanto a no haber inoculado el vector o la proteína recombinante directamente en el sitio de la lesión (Egermann *et al.*, 2006), así como por el procedimiento de lavado durante la construcción del implante con la finalidad de eliminar el exceso de vectores no replicantes. Por otro lado el uso de CMM autólogas previenen en cierta medida el rechazo del implante. Las pruebas de laboratorio antes y después de la colocación del implante también demuestran la seguridad que ofrece la terapia génica adenoviral *ex vivo*.

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* han demostrado la factibilidad de la regeneración de hueso normal utilizando el implante-3C en perro (modelo de mamífero mayor), reduciendo el periodo de consolidación en aproximadamente la mitad del tiempo (6 semanas). El implante-3C acelera la consolidación ósea, restaura la arquitectura del hueso normal (comparado con los grupos que recibieron el implante de CMM sin transducir y los que no recibieron implante) y no induce una respuesta inflamatoria importante en el área tratada. Estos experimentos también demuestran que el modelo terapéutico es seguro y que nos permite acercarnos a futuros ensayos clínicos. Esta efectividad y seguridad probablemente radica en la terapia *ex vivo* y del lavado del exceso de virus durante la construcción del implante, lo cual reduce la presentación del vector ante el sistema inmune.

REFERENCIAS

1. ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., HANKINS, G.R., BERES, E.J., ENGH, J.A., DAS, S., HUDSON S.B., KERNS K.M., KALLMES D.F., HELM G.A. (1999). In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* **10**, 2245–2253.
2. BALTZER, A.W., LATTERMANN, C., WHALEN, J.D., WOOLEY, P., WEISS, K., GRIMM, M., GHIVIZZANI S.C., ROBBINS P.D., EVANS C.H. (2000). Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* **7**, 734–739.
3. BETZ, O.B., BETZ, V.M., NAZARIAN, A., PILAPIL, C.G., VRAHAS, M. S., BOUXSEIN, M.L., GERSTENFELD L.C., EINHORN T.A., EVANS C.H. (2006). Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* **88**,355–365.
4. BLAIR, G.E. (2004). Adenoviral vectors: Adenoviral vectors, breaking a barrier to gene therapy? *Gene Ther.* **11**, 229–230.
5. CAETANO-LOPES J., CANHÃO H., FONSECA JE. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 32.103-10.
6. CAO, X., CHEN, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene.* **357**, 1–8.
7. CHANG SC, CHUANG HL, CHEN YR, CHEN JK, CHUNG HY, LU YL, LIN HY, TAI CL, LOU J. (2003). Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene Ther.* **10**. 2013-2019.

8. CHEN D, ZHAO M, MUNDY GR. (2004). Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. **22**. 233-241
9. CHENG, H., JIANG, W., PHILLIPS, F.M., HAYDON, R.C., PEND, Y., ZHOU, L., LUU, H.H., AN, N., BREYER, B., VANICHAKARN, P., SZATKOWSKY, J.P., PARK, J.Y., HE, T.C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am. **85-A**, 1544–1552.
10. COPE, J.B., SAMCHUKOV, M.L., CHERKASHIN, A.M. (1999). Mandibular distraction osteogenesis: a historic perspective and future directions. Am J Orthod Dentofacial Orthop. **115**, 448–460.
11. DELL'ACCIO F, DE BARI C, EL TAWIL NM, BARONE F, MITSIADIS TA, O'DOWD J, PITZALIS C. (2006). Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. Arthritis Res Ther. **8**.139.
12. EGERMANN, M., LILL, C. A., GRIESBECK, K., EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., SCHNEIDER, E., BALTZER A.W. (2006). Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. Gene Ther. **13**, 1290–1299. (a)
13. EGERMANN, M., BALTZER A.W., ADAMASZEK, S., EVANS, C., ROBBINS, P., SCHNEIDER, E., LILL, C.A. (2006). Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. Hum Gene Ther. **17**, 507-17. (b)
14. EINHORN, T.A., MAJESKA, R.J. MOHAIDEEN, A., KAGEL, E.M., BOUXSEIN, M.L., TUREK, T.J., WOZNEY J.M. (2003). A single

percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. J Bone Joint Surg Am. **85-A**, 1425–1435.

15.FUJII M., TAKEDA K., IMAMURA T., AOKI H., SAMPATH T.K., ENOMOTO S., KAWABATA M., KATO M., ICHIJO H., MIYAZONO K. (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation.Mol Biol Cell. **10**, 3801-3813.

16.GAISSMAIER, C., FRITZ, J., KRACKHARDT, T., FLESCHE, I., AICHER, W. K., ASHAMMAKHI, N. (2005). Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. Biomaterials. **26**, 1953–1960.

17.GEIGER M., LI R.H., FRIESS W. (2003). Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2.Adv Drug Deliv Rev. **28**;55.1613-1629.

18.GOVENDER, S., CSIMMA, C., GENANT, H.K., VALENTIN-OPRAN, A., AMIT, Y., ARBEL, R., ARO, H., ATAR, D., BISHAY, M., BÖRNER, M.G., CHIRON, P., CHOONG, P., CINATS, J., COURTENAY, B., FEIBEL, R., GEULETTE, B., GRAVEL, C., HAAS, N., RASCHKE, M., HAMMACHER, E., VAN DER VELDE, D., HARDY, P., HOLT, M., JOSTEN, C., KETTERL, R.L., LINDEQUE, B., LOB, G., MATHEVON, H., MCCOY, G., MARSH, D., MILLER, R., MUNTING, E., OEVRE, S., NORDSLETTEN, L., PATEL, A., POHL, A., RENNIE, W., REYNDERS, P., ROMMENS, P.M., RONDIA, J., ROSSOUW, W.C., DANEEL, P.J., RUFF, S., RÜTER,

- A., SANTAVIRTA, S., SCHILDHAUER, T.A., GEKLE, C., SCHNETTLER, R., SEGAL, D., SEILER, H., SNOWDOWNE, R.B., STAPERT, J., TAGLANG, G., VERDONK, R., VOGELS, L., WECKBACH, A., WENTZENSEN, A., WISNIEWSKI, T. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg Am.* **84-A**, 2123–2134.
19. HELM GA, DAYOUB H, JANE JA JR. (2001). Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus.* **10**:E4.
20. HISHIKAWA, K., MIURA, S., MARUMO, T., YOSHIOKA, H., MORI, Y., TAKATO, T., FUJITA, T. (2004). Gene expression profile of human mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermoreversible gelation polymer. *Biochem Biophys Res Commun.* **317**, 1103–1107.
21. ILIZAROV, G.A., BERKO, V.G. (1980). Morphological characteristics of the regenerate formed during experimental femoral lengthening. *Orthop Traumatol Protez.* **7**, 54–59.
22. JANE, J.A., DUNFORD, B.A., KRON, A., PITTMAN, D.D., SASAKI, T., LI, J.Z., LI H., ALDEN T.D., DAYOUB H., HANKINS G.R., KALLMES D.F., HELM G.A. (2002). Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-6 gene transfer. *Mol Ther.* **6**, 464–470.

- 23.KAWABATA M., IMAMURA T., MIYAZONO K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor. **9**:49-61.
- 24.KÖSE, G.T., KORKUSUZ, F., OZKUL, A., SOYSAL, Y., OZDEMIR, T., YILDIZ, C., HASIRCI, V. (2005). Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. Biomaterials. **26**. 5187–5197.
- 25.LI JZ, LI H, SASAKI T, HOLMAN D, BERES B, DUMONT RJ, PITTMAN DD, HANKINS GR, HELM GA. (2003). Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat.Gene Ther. **10**.1735-1743.
- 26.LOUIS-UGBO, J., MURAKAMI, H., KIM, H.S., MINAMIDE, A., BODEN, S.D. (2004). Evidence of osteoinduction by Grafton demineralized bone matrix in nonhuman primate spinal fusion. Spine. **29**, 360–366.
- 27.LUU, H.H., SONG, W.X., MANNING, D., LUO, J., DENG, Z.L., SHARFF, K. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J Orthop Res. **25**, 665-77.
- 28.OKUBO, Y., BESSHO, K., FUJIMURA, K., IIZUKA, T., MIYATAKE, S.I. (2000). Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. Biochem Biophys Res Commun. **267**, 382–387.
- 29.OREFFO, R.O., COOPER, C., MASON, C., CLEMENTS, M. (2005). Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. Stem Cell Rev. **1**, 169–178.

30. PEISTER, A., MELLAD, J.A., LARSON, B.L., HALL, B.M., GIBSON, L.F., PROCKOP, D.J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. **103**, 1662–1668.
31. PETERSON, B., WHANG, P.G., IGLESIAS, R., WANG, J.C., LIEBERMAN, J.R. (2004). Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am*. **86-A**, 2243–2250.
32. REGAZZONI C, WINTERHALTER KH, ROHRER L.(2001). Type I collagen induces expression of bone morphogenetic protein receptor type II. *Biochem Biophys Res Commun*. **283**.316-322.
33. RENGACHARY S.S. (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*.**13**, 2.
34. SNYDER, C.C., LEVINE, G.A., SWANSON, H.M., BROWNE, E.Z. (1973). Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg*. **51**, 506–508.
35. TAKAHASHI S., URIST M.R. (1986). Differentiation of cartilage on three substrata under the influence of an aggregate of morphogenetic protein and other bone tissue noncollagenous proteins (BMP/iNCP). *Clin Orthop Relat Res*. **207**. 227-238.
36. URIST, M.R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*. **150**, 893-899.
37. URIST MR, MIKULSKI A, LIETZE A. (1979). Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**.1828-32.

38. VALENTIN-OPRAN, A., WOZNEY, J., CSIMMA, C., LILLY, L., RIEDEL, G.E. (2002). Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. Clin Orthop Relat Res. **395**, 110–120.
39. VARADY, P., LI, J.Z., CUNNINGHAM, M., BERES, E.J., DAS, S., ENGH, J., ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., KERNS, K.M., KALLMES, D.F., HELM, G.A. (2001). Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. Hum Gene Ther. **12**, 697–710.
40. VARGA A.C., WRANA J.L. (2005). The disparate role of BMP in stem cell biology. Oncogene. **24**, 5713-5721.
41. ZACHOS, T., DIGGS, A., WEISBRODE, S., BARTLETT, J., BERTONE, A. (2007). Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. Mol Ther. **15**, 1543–1550.
42. ZELZER E., OLSEN B.R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. Nature, **423**. 343-348.

ANEXOS

PROTOCOLOS

Extracción de DNA viral

La extracción se hace a partir de la cosecha a gran escala de células HEK-293 infectadas, aunque la PCR puede ser hecha directamente del stock viral de la primera amplificación.

1. De la cosecha se toma una alícuota de 128 μ L. Se centrifuga a 600G/5min.
2. Resuspender el pellet en 500 μ L de TE y añadir SDS (0.6%), EDTA (10mM) y proteinasa K (200mg/ml).
3. Incubar por 2 horas a 37°C.
4. Ajustar a 1 M a partir de una solución stock de NaCl 5M.
5. Incubar en hielo por 3 horas o a 4°C toda la noche.
6. Microcentrifugar a >14,000G a 4°C por 30 minutos y remover el sobrenadante con cuidado.
7. Diluir el sobrenadante 2X con H₂O para reducir la concentración de sales.
8. Extraer el DNA cada vez con TE fenol saturado, fenol CHCl₃/ alcohol isoamílico (25:24:1) y CHCl₃/ alcohol isoamílico (24:1).
9. Agregar 2 volúmenes de etanol al 100% y centrifugar a máxima velocidad para precipitar.
10. Resuspender DNA en 50 μ L de H₂O.

Nota: La pastilla también contiene también RNA

11. Usar 4 μ L del stock viral.
12. 25 picomoles de cada primer en una reacción estándar de PCR.
13. 1 U de Taq Polimerasa en 25 μ L de volumen de reacción total.
14. Usar de 5-10 μ L para su análisis en gel de agarosa al 2%.

Nota:

Este protocolo provee suficiente DNA para desarrollar todas las cuantificaciones de acuerdo a procedimientos estándar. La cantidad de DNA usada será en función de la sensibilidad de la técnica. El DNA viral recombinante puede generar de 1000 a 10000 copias por célula, la cantidad de DNA marcado en una membrana puede reducirse por un factor de 100 a 1000 sin riesgo de pérdida de señal.

En teoría, este es el método más rápido de screening de recombinantes. Es casi imposible predecir si un set de primers funcionará o no. Cuando las condiciones de la optimización de la PCR son tomadas en consideración, el total de la cantidad de tiempo necesitada para obtener los resultados finales puede ser muy similar a otros protocolos que son cuantitativos.

Extracción y aislamiento de CMM caninas

El perro de donde se obtendrá la biopsia debe encontrarse en posición de decúbito dorsal y bajo sedación con ketamina y la región escapulo humeral rasurada. Se realiza asepsia de la zona con yodopovidona espuma y se aplica 2 ml de xilocaína + epinefrina.

1. Se realiza una incisión de 1cm y se disecciona por planos hasta llegar a cápsula articular de la cabeza humeral.
2. Con un troquer para biopsia ósea se orada a una profundidad de 1.5 a 2 cm a partir de la cápsula articular. En caso de hemorragia aplique cera para hueso. Se sutura por planos.
3. El cilindro obtenido se transporta en solución de NaCl al 0.09% estéril.
4. En campana de flujo se separa el hueso esponjoso y se desecha el resto del material.
5. El hueso esponjoso se macera con bisturí lo más posible y se colocan los fragmentos en frasco con agitador magnético y se agrega solución de tripsina al 0.25% suficiente para cubrir la muestra.
6. Se incuba por 50 minutos en agitación a 37°C.
7. Se recupera el sobrenadante, se centrifuga a 3000 rpm por 1 minuto, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 10 ml DMEM con 20% de suero bovino fetal, 0.1% de gentamicina, 1% de amfotericina B, 1% de ampicilina/kanamicina, y β -glicerolfosfato 20 mM y se siembra en frasco T 75.

8. Al resto de la muestra sin digerir se agrega una solución de colagenasa a una concentración de 1 mg/ml y se pone en agitación de 35 a 45 minutos a 37 °C en 2 ocasiones
 9. Al termino de cada digestión se repite el paso 8.
 10. A las 24 h se cambia el medio de cultivo para limpiar impurezas y evitar contaminaciones. Con el medio antiguo se sigue el mismo procedimiento del paso 8.
 11. Se cambia el medio cada 24 h hasta dejar los cultivos libres de impurezas
 12. Las células que queden adheridas al sustrato corresponden a las CMM. Deben subcultivarse al alcanzar el 70% de confluencia.
- Nota:** no se recomienda realizar más de 5 subcultivos.

Las CMM autólogas fueron aisladas a partir de biopsias de las epífisis humerales de los perros receptores bajo sedación y anestesia local. Las biopsias fueron fragmentadas y digeridas progresivamente con y, las CMM fueron recuperadas por centrifugación y separadas por adherencia en frasco te como fuente de sales minerales. El medio fue cambiado cada 24 h hasta alcanzar confluencia de 70% (alrededor de 7–10 días). Se realizó hasta dos pasajes cuando fue necesario hasta obtener alrededor de 1.5×10^7 células en total. La MHD fue procesada y liofilizada en el Banco de hueso del Hospital Universitario de la Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Cultivo tridimensional de CMM en MHD

Se parte de un número conocido de CMM en cultivo en monocapa (por ejemplo 1×10^5).

1. Se realiza un lavado con PBS para eliminar el exceso de medio de cultivo, se añade solución de tripsina al 0.25% y se incuba a 37 °C por 20 minutos.
2. Se inactiva la tripsina con el mismo volumen de medio con suero bovino fetal, las células se disgregan y se recupera la totalidad de estas.
3. La suspensión de CMM se concentra por centrifugación a 3000 rpm, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 75 μ l de DMEM con 20% de suero bovino fetal, 0.1% de gentamicina, 1% de amfotericina B, 1% de ampicilina/kanamicina, y β -glicerolfosfato 20 mM.
4. El concentrado celular se utiliza para reconstituir un volumen similar de MHD previamente colocada en placa de 96 pozos. La matriz y la suspensión de CMM se mezclan y compactan gentilmente en una especie de masilla.
5. Se añade más medio completo gota a gota por la pared del pozo hasta llenar por $\frac{3}{4}$ del mismo.
6. Deberá cambiarse el medio de cultivo cada 24 para evitar pérdidas por evaporación, para esto se recuperará primero el medio de cultivo viejo lentamente desde la superficie de líquido y tratando de no tocar la matriz.
7. Para añadir más medio de cultivo siga el paso 6.
8. El experimento se prosigue tantos días como se requiera, al término del cual se retira el medio de cultivo como se explica en el paso 7. Eliminado el

medio de cultivo se añade de criopreservación Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA), se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se mete la placa a -70°C y se conserva así hasta ser utilizado.

9. Para remover el cilindro que contiene el cultivo tridimensional se lleva la placa al interior de un criotomo (20°C). Con ayuda de un punzón se disectan los bordes y posteriormente se calienta el fondo del pozo con la yema de un dedo al tiempo que se extrae el cilindro con ayuda de unas pinzas.
10. Se realizan los criocortes y se realizan las tinciones necesarias.

Construcción del implante-3C

1. Se siembran 1.5×10^7 CMM con DMEM con 3% de suero bovino fetal (SBF) y se deja reposar de 3 a 5 horas para que las CMM se adhieran.
2. Se retira el medio con suero y se lava gentilmente con PBS.
3. Se añade DMEM sin SBF al que previamente se agregó una MOI de 1×10^4 del vector Ad-BMP-2. Se incuba a 37°C y se deja reposar durante 3 horas menéandolo suavemente en intervalos de 30 minutos.
4. Se agrega suavemente y por las paredes del frasco un volumen igual de DMEM con 3% de SBF y se deja reposar toda la noche.
5. A la siguiente mañana las células se lavan con PBS en 3 ocasiones para lavar el excedente de vectores.
6. Se recuperan las CMM modificadas agregando solución de tripsina al 0.25% y dejando incubar entre 20 y 40 minutos hasta que casi la totalidad de CMM se desprendan espontáneamente.
7. Se disgregan mecánicamente con el pipetor automático y se termina de separar la masa celular del sustrato.
8. Se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 3000 rpm por 1 minuto, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 2 ml de PBS, se vuelve a centrifugar y repetir el procedimiento hasta completar 3 lavados para eliminar el exceso vectores virales.

9. En el último lavado las células se resuspenden en 250 μl de DMEM libre de SBF. La suspensión de células se usa para reconstituir 0.25 cm^3 de polvo de MHD en un tubo de 2 ml y se mezcla gentilmente.
10. El implante recién creado se transporta en hielo, a oscuras y se aplica en un lapso de 2 horas.

Extracción de proteínas

1. Retirar el medio de cultivo y lavar las células con PBS 1X (en caso de que las células no estén maltratadas).
2. Adicionar 1 ml de PBS 1X pH 7.4 + EDTA 01 mM a cada placa de 35 x 10 mm y despegarlas con ayuda de un escrapper.
3. Colocar las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 4°C por 10 segundos (spin).
4. Retirar el sobrenadante y agregar a la pastilla celular 10 volúmenes de buffer de lisis 1X frío (para células provenientes de una placa de 35 x 10mm se agrega 50 µl de buffer). Se puede adicionar hasta 250 µl del buffer de lisis 1X completo.
5. Incubar en hielo por 20 minutos.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 5-10 minutos a 4°C.
7. Remover el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo y descartar la pastilla.
8. Cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford.
9. Almacenar los extractos de proteínas a -70°C por tiempo indefinido o a -20°C a corto plazo.

Nota:

El PBS 1X + EDTA 1mM se utiliza para despegar las células que crecen en monocapa. Las células en suspensión únicamente se empastillan por centrifugación.

- En las placas de 100 x 20 mm se utilizan 2 ml del buffer PBS 1X + EDTA 1mM y se empastillan a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Si la confluencia celular es menor del 30% se utilizan 50 µl de buffer de lisis, si la confluencia es de aproximadamente entre 50-60% se utilizan de 60 a 80 µl de buffer, si la confluencia es del 100% o superior se emplean de 200 a 250 µl de buffer, respectivamente.
- El buffer de lisis completo 1X es estable hasta por 2 semanas.

Cuantificación de proteínas por microensayo de Bradford

1. Preparar en agua estéril una solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
2. Hacer una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quede a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
3. Preparar directamente en las celdas de plástico los siguientes estándares empleando el stock diluido de BSA:

Estándar	µl del estándar de 2 mg/ l	µl del agua	Concentración µg/µl
1	0	800	0
2	1	799	2
3	2.5	797.5	5
4	5	795	10
5	7.5	792.5	15

4. Adicionar 200 µl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y mezclar.
5. Incubar las celdas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las absorbancias pueden aumentar con el tiempo de incubación, por lo que **no** se recomienda incubar las muestras por más de una hora.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

Nota:

- Para determinar la concentración de proteínas en las muestras problema se colocan 2 μl del extracto de proteínas más 798 μl de agua. La concentración que se obtenga en $\mu\text{g/ml}$ se divide entre dos, ya que se utilizaron 2 μl de cada una. La concentración se reporta en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- En el biofotómetro se colocan las unidades de $\mu\text{g/ml}$ y regresión no lineal.
- La linealidad del método es de 1 – 25 $\mu\text{g/ml}$.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

1. Preparar la solución del gel separador (separating gel) con la concentración apropiada de acrilamida.
2. Aplicar con una pipeta serológica 4.5 ml de la solución del gel separador al vidrio que contiene el separador de 1 mm, y cubrir el gel con Isopropanol absoluto para favorecer la polimerización. Después, de 10 minutos invertir el gel para remover el Isopropanol.
3. Preparar la solución del gel concentrador (stacking gel), vaciarlo hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine.
4. Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo para después añadir el buffer de corrida 1X.
5. Retirar el peine y lavar los pocillos con buffer para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado.
6. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de desnaturalización en una relación 1:1, y calentarlas a 95°C por 4 minutos.
7. Correr el gel a 80V por aproximadamente 2.5 horas.

Western-blot

1. Recortar una membrana nitrocelulosa con las dimensiones de 6.0 cm de largo x 8.5 cm de largo.
2. Lavar la membrana con agua destilada por 5 minutos y equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X durante 10 minutos. Colocar también en el buffer de transferencia dos piezas de papel filtro.
3. Remover y descartar el gel concentrador (stacking gel).
4. Colocar sobre el gel un papel filtro húmedo y despegar el gel del vidrio. Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
5. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Eliminar burbujas con la pipeta rolling.
6. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, y enseguida colocar la otra esponja.
7. Transferir a 4°C a 100V durante 1 hora, ó a 50V por 3 h ó a 35V toda la noche.
8. Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau durante 5 minutos
9. Enjuagar la membrana teñida 3 veces con buffer PBS-T 1X, y marcar con lápiz los pesos moleculares del marcador.
10. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo 1X a 4°C durante 1h o toda la noche con agitación.
11. Posteriormente, lavar la membrana 2 veces con PBST 1X por 10 minutos cada uno de los lavados a temperatura ambiente.

12. Incubar la membrana con el anticuerpo primario (1:1000) toda la noche a 4°C y con agitación (ver notas).
13. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
14. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (1:1000) por 2h a 4°C y con agitación.
15. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
16. Al terminar los lavados se procede al revelado, coloque la membrana en 10 ml de una solución tibia de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclicada (DAB) al 0.05% diluida en PBS 1X.
17. Agregue 10µl de H₂O₂ al 30% (agua oxigenada comercial) y mezcle gentilmente.
18. Incube a temperatura ambiente y agitación suave
19. Monitoree el progreso de la reacción cuidadosamente, cuando aparezcan las bandas (2-5 minutos) lave gentilmente con agua destilada.
20. Seque la membrana con papel filtro, envuelva en plástico transparente y fotografíe.

Nota:

- El anticuerpo diluido reutilizar hasta 3 veces.
- Se puede buscar diluciones entre 1:100 a 1:1000 si es necesario.
- Los lavados son a temperatura ambiente y las incubaciones con los anticuerpos son a 4°C.

- Los anticuerpos se pueden preparar en leche o en BSA.
- La solución de Ponceau se puede reutilizar.
- La DAB, es un producto nocivo que hay que manipular con muchísima precaución, ya que es cancerígena. Para esta solución no hay stock, se prepara en el momento y se desecha convenientemente.

qRT-PCR

Este protocolo está diseñado para el kit de qRT-PCR SuperScript III Platinum SYBR Green de un paso de Invitrogen Inc. en un equipo para PCR en tiempo real ABI-7000.

1. Montar en tubos indicados para el equipo la siguiente reacción (volumen para una reacción:

Componente	Volumen
SuperScript™ III RT/Platinum <i>Taq</i> Mix	1 µl
2X SYBR® Green Reaction Mix*	25 µl
Forward primer, 10 µM	1 µl
Reverse primer, 10 µM	1 µl
ROX Reference Dye (opcional) 1 µl/0.	1 µl
RNA (de 1 pg a 1 µg total de RNA)	≤ 10 µl
Agua DEPC	aforar a 50 µl

* Incluye el inhibidor de RNasa RNaseOUT de Invitrogen

Nota:

- En caso de tener más de un tubo hacer un *master mix*.
 - Verifique antes la calibración de sus micropipetas.
2. Tapar el tubo o placa de reacción y mezcle suavemente. Asegúrese que todos los componentes se encuentren en el fondo al final, centrifugue si es necesario.
 3. Transportar en hielo.
 4. Correr el siguiente programa en el equipo de PCR (previamente programado):

50°C por 3 minutos
(la síntesis del cDNA se puede dar en un rango de 42–60°C)
95°C por 5 minutos
Correr 40 ciclos de:
95°C por 15 segundos
60°C por 30 segundos
40°C por 1 minuto

Analizar las curvas de amplificación en un programa de estadística.

SOLUCIONES

Preparación de Soluciones

PBS 10X

Reactivos	Cantidad	[Final]
-----------	----------	---------

NaCl	80 g	8%
------	------	----

KCl	2 g	0.2%
-----	-----	------

Na ₂ HPO ₄	14.4 g	1.44%
----------------------------------	--------	-------

KH ₂ PO ₄	2.4 g	0.24%
---------------------------------	-------	-------

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 litro con agua destilada

PBS 1X + EDTA 1 mM

[Inicial]	Cantidad	[Final]
-----------	----------	---------

PBS 10X	10 ml	1X
---------	-------	----

EDTA 0.5 M pH 8.0	200µl	1 mM
-------------------	-------	------

Ajustar a 100 ml con agua destilada

Buffer de Lisis 5X

[Inicial]	Cantidad	[Final]
-----------	----------	---------

Triton X-100 100%	5 ml	5%
-------------------	------	----

Tris-HCl 1 M pH 7.5	5 ml	50 mM
---------------------	------	-------

KCl 2 M	12.5 ml	250 mM
---------	---------	--------

MgCl ₂ 1 M	1 ml	10 mM
-----------------------	------	-------

Aforar a 100 ml con agua destilada

Soluciones Stock de Inhibidores de Proteasas

Reactivos	[Inicial]
Aprotinina	10 mg/ml
Leupeptina	10 mg/ml
Pepstatina	1 mg/ml
Ditiotritol (DTT)	0.1 M
Fluoruro de sodio	500 mM
Vanadato de sodio	100 mM
Microcistina	0.4 mM
Ácido okadaico	100 μ M
Tableta de Inhibidores de proteasas	1 tableta en 1 ml de agua
ROCHE*	

*Nota: la tableta contiene la mayoría de los componentes individuales y se puede usarse sola.

PMSF 0.5 M

Reactivo Cantidad

PMSF 0.0871 g

Aforar a 1 ml con isopropanol

6. Buffer de Lisis Completo 1X

Reactivos	Cantidad
Buffer de lisis 5X	2 ml
Stock de aprotinina	3 μ l
Stock de leupeptina	1 μ l
Stock de pepstatina	10 μ l
Stock de ditionitrol (DTT)	10 μ l
Stock de fluoruro de sodio	1 ml
Stock de vanadato de sodio	10 μ l
Stock de microcistina	6.25 μ l
Stock de ácido okadaico	0.5 μ l
Stock de inhibidores de proteasas	400 μ l
Pmsf 0.5 m	10 μ L
Volumen Total	10 ml

Aforar a 10 ml con agua destilada

*Nota: El stock de inhibidores de proteasa contiene la mayoría de los componentes individuales y puede usarse sola.

Acrilamida/ Bisacrilamida

Reactivos	Cantidad
Acrilamida 30% T	87.6 g (29.2 g/ 100 ml)
Bisacrilamida (N'N'-bis-metilen-acrilamida) 2.67% C	2.4 g (0.8 g/100 ml)

Aforar a 300 ml con agua destilada, almacenar a 4°C y protegerla de la luz

SDS 10% (w/ v)

Reactivo	Cantidad
SDS	10 g

Aforar a 100 ml con agua destilada. El SDS es tóxico, por lo que se recomienda utilizar cubrebocas para pesarlo y prepararlo.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	27.25 g	1.5 M
SDS	0.6 g	0.4%

Ajustar a pH 8.8 con HCl y aforar a 150 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Reactivo: Cantidad [Final]

Tris base 6 g 0.5 M

SDS 0.4g 0.4%

Ajustar a pH 6.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

Buffer de Desnaturalización 4x

Reactivo Cantidad [Final]

Tris-HCl 1 M pH 6.8 12.50 ml 130 mM

Glicerol 20 ml 20%

SDS 10% 20 ml 2%

Azul de bromofenol 0.1 g 0.1%

β-mercaptoetanol 1 ml 1%

Volumen Total 53.5 ml

Diluir las muestras 1:1 con el buffer y calentarlas a 95°C por 4 minutos. Almacenar el buffer de desnaturalización a 4°C.

Buffer de Corrida 5X

Reactivos	Cantidad [Final]	
Tris base	15.1 g	125 mM
Glicina	94 g	1.25 M
SDS	5 g	0.5%

Aforar a 1 litro con agua destilada y almacenar a 4°C

Persulfato de amonio (PSA) 10%

Reactivo Cantidad

PSA 100 mg

Disolver en 1 ml de agua destilada y almacenar a -20°C

Preparación del Gel de Poliacrilamida (10 ml)

Gel	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	12%	14%
H ₂ O	6.1	5.7	5.4	5.1	4.7	4.4	4.1	3.4	2.7
A/B 30% (ml)		1.3	1.7	2.0	2.3	2.7	3.0	3.3	4.0
*Buffer (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SDS 10% (ml))	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
PSA 10% (μl)		100	100	100	100	100	100	100	100
TEMED (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*Gel Separador- Tris-HCl pH 8.8 1.5M

*Gel Concentrador- Tris-HCl pH 6.8 0.5M

Las cantidades de PSA y TEMED deben ser ajustadas dependiendo del volumen de gel que se prepara.

Buffer de Bloqueo con Leche

Reactivos	Cantidad
Leche descremada en polvo	1.2 g
PBS 10X	4 ml
Tritón X-100 100%	0.2 ml
Azida de sodio (NaN ₃) 2%	0.4 ml

Aforar a 40 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

Buffer de Bloqueo con Albúmina Sérica Bovina (BSA)

Reactivos	Cantidad
BSA	1.5 g
PBS 10X	3 ml
Tritón X-100 100%	30 µl

Aforar a 30 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

Buffer de lavados PBS-T 1X para Leche

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Tritón X-100 100%	2 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

Buffer de lavados PBS-T 1X para BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Tritón X-100 100%	0.4 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

Solución de Ponceau 0.1%

Reactivos	Cantidad
Ponceau S	0.2 g
Ácido acético	10 ml

Aforar a 200 ml con agua destilada

Anticuerpo dilución 1:1000 con Leche

Reactivos	Cantidad
Anticuerpo	10 μ l
Buffer de bloqueo con leche	10 ml

5. Anticuerpo dilución 1:1000 con BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	1 ml
BSA 1%	0.1 ml

Aforar a 10 ml con agua destilada y adicionar 10 μ l del anticuerpo

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Monterrey, Mexico. Oct. 26th, 2007

James M. Wilson, M.D., Ph.D.

Editor-in-Chief

Human Gene Therapy

University of Pennsylvania School of Medicine

Gene Therapy Program

Department of Pathology and Laboratory Medicine

Suite 2000, Translational Research Laboratories

125 S. 31st Street

Philadelphia, PA 19104-3403

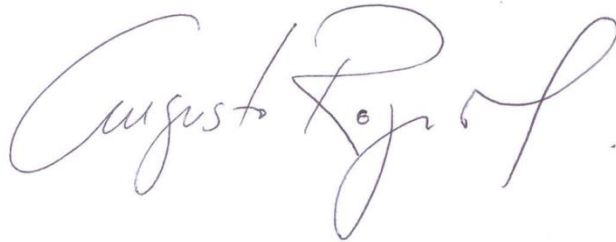
Dear Dr. Wilson.

Enclosed you will find the manuscript "Mesenchymal Stem Cells Transduced Ex-Vivo with hBMP-2 Improve Bone Regeneration in a Canine Model of Mandible Distraction Surgery." authored by Cervantes-Kardasch, *et al.* This article describes the preclinical studies for bone regeneration in a canine model, in which an implant consisting of mesenchymal stem cells transduced with an adenoviral vector expressing the bone morphogenetic protein-2 and embedded in a demineralized matrix is used to regenerate bone in a jaw distraction surgery. We start with the *in-vitro* analyses performed to demonstrate that the implant facilitates the repopulation of the gene-modified stem cells, the production of type I collagen, and the formation of calcium deposits. Subsequently, we show how this implant reduced the bone consolidation time in almost the half of the time required for this process in the control dogs. We also show that the histology of the regenerated bone resembles some of the features of the mature bone architecture. We also describe some mechanical tests to conclude that the resistance and the hardness of the replaced bone are similar than in healthy bone. Studies about safety are also described. We think that this work is crucial to demonstrate the benefit of this approach in a "big mammal model", which is also immunocompetent and has genetic heterogeneity.

I hope that you will find the article satisfactory for its revision and publication.

Many thanks for your attention and considerations.

Yours sincerely,

A handwritten signature in purple ink, reading "Augusto Rojas-Martínez". The signature is fluid and cursive, with the first name "Augusto" being larger and more prominent than the last name.

Augusto Rojas-Martínez, M.D./D.Sc.

Department of Biochemistry

School of Medicine

Universidad Autónoma de Nuevo León

Av. F. I. Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Colonia Mitras Centro

Monterrey, Mexico, C.P. 64460

Telephone: ++52-81-83 29 41 74

Fax: ++52-81-83 33 77 47

E-mail: arojas@fm.uanl.mx

Title: Mesenchymal Stem Cells Transduced *Ex Vivo* with hBMP-2 Improve Bone Regeneration in a Canine Model of Mandible Distraction Surgery.

Authors' names, degrees and affiliations: Víctor H. Cervantes-Kardasch, M.D./M.Sc.¹; Yanko Castro-Govea, M.D.²; Rocío Ortiz-López, D.Sc.¹; Eduardo Álvarez-Lozano, M.D.³; Daniel Cervantes-García, M.Sc.¹; Marco A.L. Hernández-Rodríguez, Ph.D.⁴; Gerardo Padilla-Rivas, D.Sc.¹; Christian I. Silva-Platas, M.Sc.¹, José L. Vázquez-Juárez, D.V.Z.⁵; Herminia Martínez-Rodríguez, D.Sc.¹; José A. Morales de los Santos¹; Víktor Romero-Díaz, M.Sc.⁶; Alberto Pérez-Unzueta, Ph.D.⁴; Augusto Rojas-Martínez, M.D./D.Sc.^{1*}.

Affiliations: 1. Department of Biochemistry, 2. Service of Plastic and Reconstructive Surgery, 3. Service of Orthopedics and Human Bone Biorepository, 5. Department of Physiology, 6. Department of Morphology, School of Medicine and University Hospital, and 4. School of Electric and Mechanical Engineering. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Mexico.

Correspondence:

*Dr. Augusto Rojas-Martínez

Department of Biochemistry, School of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León

Av. F. I. Madero S/N. Colonia Mitras Centro. Monterrey, N.L., Mexico. C.P. 64464

Telephone number: ++52-81-8329 4174, Fax number: ++52-81-8333 7747

E-mail: arojas@fm.uanl.mx

Running title: Modified MSCs for Bone Regeneration in Dog

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are actively involved in the ossification process, and BMP-2 participates throughout the entire process. Gene therapy for bone regeneration using adenovirus-expressing BMPs has been successful in small mammals, but it has not been completely satisfactory in large mammals. We generated a three-component implant (3C-graft) comprising autologous mesenchymal stem cells (MSCs), which has been transduced *ex vivo* with adenovirus-expressing BMP-2 and embedded in a demineralized human bone matrix. The 3C-grafts were cultivated for 10 days to study *in vitro* bone formation. Non-transduced MSCs stimulated with dexamethasone and vitamin C were used as positive controls. MSCs transduced with adenovirus- β -galactosidase and non-transduced MSCs served as a negative control. Osteoblast population and mineralization of the extracellular matrix were greater in the 3C-graft cultures than in the controls. 3C-grafts were used to fill osteotomies created by bone distraction surgery in mongrel dogs. Control groups comprised dogs with bone distraction alone and dogs with non-transduced MSC-grafts. The radiography follow-up, performed 10 weeks after distraction, demonstrated a reduction in the consolidation period to almost half the time required in the controls. Post-mortem mandibles submitted for anatomical and histological analyses showed improved remodeling and bone maturation in the 3C-grafted dogs. Mechanical studies showed greater resistance in the 3C-grafted bones than in bones in the other groups, while bone stiffness showed no differences among groups. Remarkably, inflammatory infiltrates were not observed in any of the treated areas and no liver toxicity was detected.

INTRODUCTION

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the TGF β superfamily. Their main function is to promote bone formation by directing cell differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to osteoblasts and osteocytes, which in turn build the extracellular matrix (Einhorn *et al.*, 2003). Over 20 BMPs have been described so far (Cao and Chen, 2005), and BMP-2, 4, 6, and 9 are the main osteogenic inducers (Alden *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2003; Jane *et al.*, 2002; Varady *et al.*, 2001).

BMPs have been tested successfully in orthotopic and heterotopic rodent models of bone regeneration treated with gene transfer or local infusion of recombinant proteins (Okubo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004) *in vivo* (Cheng *et al.*, 2003; Baltzer *et al.*, 2000) with impressive results. However, gene therapy experiments have failed in large mammals, probably because of the immune responses against the adenoviral vector and its transgene product (Blair, 2004; Egermann *et al.*, 2006a).

Cultured MSCs have proven osteoinductive activity (Peister *et al.*, 2004). These progenitor cells can differentiate more rapidly into bone-synthesizing cells if they are maintained in three-dimensional structures like polymers, ceramics, or bone-derived matrices (Gaissmaier *et al.*, 2005; Köse *et al.*, 2005). Some authors have reported that a residual amount of BMPs retained in bone-derived matrices is advantageous for bone implants (Peterson *et al.*, 2004; Louis-Ougbo *et al.*, 2004). Interestingly, the first osteogenic inducer described was

demineralized bone matrix (DBM) (Urist, 1965). Accordingly, DBM can serve for two purposes in tissue engineering: as a scaffold support matrix and to stimulate bone induction.

Bone distraction surgery is used frequently by surgeons to repair bone deformations (Ilizarov and Berko., 1980; Snyder *et al.*, 1973). In this surgery, the borders of a generated osteotomy are separated mechanically with a device implanted in the borders of the bone lesion until a desired distance is achieved, followed by a consolidation period of 12 to 16 weeks for complete restoration (Cope *et al.*, 1999).

We report on the development of a three-component graft (3C-graft) made up of autologous MSCs transduced *ex vivo* with adenovirus-expressing BMP-2 (AdBMP-2) and embedded in DBM. This engineered graft significantly decreased the consolidation period in an experimental model of bone distraction surgery in mongrel dogs. We present evidence of improved bone regeneration in terms of anatomical structure, radiographic follow-up and mechanical characteristics of the healing tissue.

METHODS

AdBMP-2. This vector was kindly provided by Dr. Christopher Evans and has been described elsewhere (Betz *et al.*, 2006). Briefly, this $\Delta E1/E3$ type 5 adenovirus contains the cytomegalovirus enhancer/promoter sequence that controls the expression of the coding sequence for human BMP-2.

Isolation of MSCs and DBM. The autologous MSCs were isolated from humeral epiphyseal biopsies of recipient dogs under sedation and local anesthesia. These biopsies were grounded and digested with 0.25% trypsin solution plus 1 mg/ml collagenase, and MSCs were recovered by centrifugation and separated by flask adherence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 20% fetal bovine serum, 0.1% gentamicin, 1% amphotericin B, 1% ampicillin–kanamycin, and 20 mM β -glycerophosphate. The medium was changed every 24 h until 70% confluence (about 7–10 days). Sometimes an additional passage was required to obtain about 1.5×10^7 cells in total. The DBM was processed and lyophilized in the Human Bone Repository at the University Hospital, University of Nuevo Leon (UANL).

Animal model. Healthy mongrel dogs weighing 20–25 kg used in these experiments were provided by the Municipal Antirabic Service and were adapted, maintained, and treated in the animal facilities of the School of Medicine, UANL, following the Mexican ordinances for the treatment of experimental animals (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999). The protocol was submitted and accepted by the Internal Review Board of the School of Medicine, UANL.

Biological activity of human BMP-2 (hBMP-2) in dog MSCs (*in vitro* studies). MSCs (1×10^5 cells) were transduced overnight with AdBMP-2 at 1×10^3 to 1×10^5 MOIs

(multiplicities of infection) in 96-well plates. Media was completely replaced after transduction. Mock- and Ad- β -galactosidase (Ad- β -gal)-transduced cells were used as negative controls, and non-transduced cells treated with 1 nM dexamethasone were used as positive controls. Biologic activity tests included alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression and canine type 1 collagen protein expression. The observation time points for these experiments were 24, 48, and 96 h after transduction.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). qPCR was used to quantify the production of ALP mRNA. RNA was isolated 24, 48, and 96 h after transduction using the Versagene kit (Gentra Systems Inc. Minneapolis, MN) and cDNA was synthesized with the Superscript Platinum kit (Invitrogen, San Diego, CA) following the manufacturers' instructions. The primers for ALP mRNA qPCR analysis were 5' TGGAACCGCACGGAAGCTC 3' (sense) and 5' GCTCAAAAGAGACCCAAGAGGTAGT 3' (antisense). For normalization, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was quantified using the primers 5' ATGGAAATCCCATCACCATCTT 3' (sense) and 5' CGCCCCACATTGATTTTGG 3' (antisense). qPCR was performed in an ABI-7000 instrument (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA).

Western blot assays. hBMP-2 and canine type 1 collagen were detected by Western blot analysis. Eighty micrograms of total protein extract in Laemmli buffer was subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and nonfat milk 5% phosphate buffer saline (PBS) was used for blocking. Primary goat polyclonal antihuman-BMP-2 IgG (dilution 1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) and mouse monoclonal antidog-COL1 IgG (dilution 1:100) (Abcam plc,

Cambridge, UK) were used to detect human BMP2 and dog type 1 collagen, respectively. A commercial standard for hBMP-2 was used as a control (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Bound antibodies were detected in 5% nonfat milk PBS with horseradish peroxidase conjugated chicken antigoat-IgG and goat antimouse-IgG antibodies against human (by cross-reaction) and mouse IgG, respectively, and revealed with diaminobenzidine.

***In vitro* bone generation.** For these experiments, the same sets of experimental groups mentioned above were implemented. After overnight post-transduction, the cells were recovered, washed three times in PBS, embedded in the DBM, and incubated in a 96-well plate for 10 days. The medium was changed every 24 h. The grafts were embedded in Tissue-Tek compound (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA) for microscopic studies and counterstained with hematoxylin and eosin (H&E), Gomori, and von Kossa stains to evaluate the histological patterns of collagen matrix and bone calcification.

***In vivo* assays.**

To create the 3C-grafts, 1.5×10^7 cultured dog MSCs were transduced overnight at MOI of 1×10^4 . The next morning, the cells were washed, harvested with 0.25% trypsin solution, resuspended in 250 μ l of serum-free DMEM media, and embedded in a similar volume of powder DBM. The control graft with non-transduced MSCs was prepared using the same protocol. Dogs were allocated in three groups (n = 3 each) for the mandible bone distraction and graft experiments. Two groups received a graft (3C-graft for group I and control graft for group II) and the last did not receive any graft (group III).

Bone distraction surgery. Distraction surgeries were performed under general anesthesia with ketamine–pentobarbital. The mandible borders of the osteotomy were fixed with bone distractor devices. Grafts were washed in PBS to remove vector excess before implantation and were engrafted inside the osteotomy defect. The borders of the osteotomy were covered with periosteum. Bone distraction was performed at 1 mm/day for 10 days.

Postsurgical follow-up. Liver function tests were performed before and 2 weeks after surgery. These included prothrombin time (PT) and the concentrations of albumin (ALB), globulin (GLOB), total bilirubin (TB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), ALP, lactic dehydrogenase (LDH), and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). Imaging follow-up of the operated area was done by radiography every 2 weeks after the last distraction, during 10 weeks.

Post-mortem studies. In the 10th week, dogs were killed by i.v. administration of pentobarbital–KCl solution. The treated bone areas of the mandible were recovered, fixed in 10% formaldehyde for 5 days, and demineralized in 5% HCl for 10 days. Paraffin-embedded sections were counterstained with H & E and Masson's trichrome stains to study bone formation, architecture, and inflammation.

Mechanical tests. Rectangular bone pieces including the consolidation area were obtained from the treated mandibles and washed in deionized water to prepare a solid bone structure free of soft tissues. For the [three-point bending](#)-test, different rectangular bone pieces were placed in a cylindrical device, and pressure was applied in the middle section by a rounded end punch. When fracture occurred, the maximum flexion stress (σ_{\max}) was calculated with the formula: $\sigma_{\max} = Mc/I$, where M is the flexion momentum,

c is the half of the section thickness, and I is the moment of inertia for a rectangular piece, as defined by: $I = ba^3/12$; where b is the base and a is the height.

For Vickers microhardness test, bone pieces were cleaned by ultrasound in 2:1 chloroform–ethanol solution and embedded in a resin, following the Bonser’s method (Bonser *et al.*, 1996). Hardness was analyzed in a Vickers hardness tester settled to apply a 25 g load for 15 s. Indentations resulting from this operation were measured under the microscope. The Vickers hardness value (HV) was obtained according to the next formula: $HV=185 P/d^2$, where P is the load applied in grams and d the arithmetical mean of the two diagonals, $d1$ and $d2$ in mm.

Statistical analysis. All data resulted from triplicate measurements. Parametric data were analyzed for significance using one-way ANOVA and Student’s t test using the SPSS version 13 software (SPSS-UK Ltd, St. Andrews House, UK) and considering a P -value of 0.05 or less for a significant difference. Representative data are presented as mean \pm standard deviation of independent replicates.

RESULTS

***In vitro* biological activity of the transduced hBMP-2 in MSCs.** ALP expression increased in both AdBMP-2-transduced and dexamethasone-stimulated MSCs (positive control), and the highest peaks appeared after 48 h (Figure 1A). At 10^4 MOI, ALP expression was 44% higher in the AdBMP-2-transduced MSCs than in the positive control ($P < 0.001$), but unchanged from the basal level in the Ad- β -gal-transduced MSCs. Western blot analysis corroborated the restricted expression of hBMP-2 in the AdBMP-2-transduced MSCs and in the positive commercial control (Figure 1B). Type 1 collagen expression did not differ between treatments (Figure 1C).

***In vitro* histology of the DBM-embedded MSC cultures.** The H&E staining revealed significantly more cells ($P < 0.01$) in the AdBMP-2-transduced MSCs (539 ± 27 cells/field) and in the positive control (102 ± 13 cells/field) than in the Ad- β -gal-transduced or mock-transduced MSCs (45 ± 12 and 44 ± 8 , respectively). The distribution of type 1 collagen (Gomori staining) did not differ between treatments, although mineralization (von Kossa staining) in the extracellular matrix was more evident in the AdBMP-2 transduced-MSCs and the positive control, as shown by greater staining for insoluble calcium salts (Figure 2).

***In vivo* studies.** The radiographic follow-up demonstrated complete consolidation in mandibles treated with the 3C-graft in the sixth week after distraction, whereas the mandibles in the two other groups showed partial consolidations in the eighth week. These results indicate that reduction occurred in about half the time needed for consolidation in the 3C-grafted group (Figure 3A).

Macroscopic postmortem analysis of the 3C-grafted mandibles performed 10 weeks after distraction showed a bone with almost normal aspect and hardness, in which the

adhering surrounded tissue was easy to remove from the regenerated periosteum. Extensive areas of fibrous callus in the engrafted area were noticed in all non-transduced MSC-grafted jaws (lesions that manifested as tumors during the post-treatment evolution). Incomplete consolidation was evident in the non-grafted group, in which the mandibles showed the expected osteum callus usually observed during the evolution of distracted bone defects (Figure 3B).

Analysis of the H & E-stained tissues from the treated areas showed reconstitution of mature bone in the mandibles treated with the 3C-grafts, comprising periosteum, lamellar bone, and bone marrow. The extensive areas of fibrotic tissue were confirmed in the non-transduced MSC-grafted animals, and abundant and disperse cores of osteoblastic activity were observed. Regenerative lesions in the non-grafted tissues were characterized by large areas of osteoblastic activity and few trabecular zones. Masson's trichrome staining confirmed the presence of newly formed bone marrow and trabecular bone, mainly in the 3C-grafted jaws, areas of diffuse osteoblastic activity in non-grafted mandibles, and active cores of bone synthesis in jaws treated with the non-transduced MSC-grafts (Figure 3C).

Safety studies

No signs of systemic or liver toxicity were detected in the blood tests in any of the treated groups during the study (Table 1).

Flexion and Vickers hardness tests. The σ_{\max} values in Table 2 show the resistance of the regenerated bone in the consolidation area. The maximum values were recorded for 3C-grafted jaws, followed by the non-transduced MSC-grafted, and non-grafted mandibles.

The Vickers hardness (VH) values showed no significant differences on the treated mandibles among groups. The Vickers hardness number (VHN) for the groups were 45 VHN for group I, 43 VHN for group II and 43 VHN for group III. The VH in non-distraction jaws were 63.8 VHN.

DISCUSSION

BMPs, particularly BMPs 2 and 7, scaffold biomaterials, and MSCs are being tested alone or in combination for use in bone regeneration in fractures, vertebrae fusion, and distraction surgeries in different experimental models with variable results (Orefo *et al.*, 2005). Human recombinant BMPs 2 and 7 are currently FDA-approved drugs for restricted clinical uses (Govender *et al.*, 2002; Valentin-Opran *et al.*, 2002), but the short half-life limits their use in bone healing. BMP-2 gene transfer, particularly with a non-replicant adenoviral vector, can sustain production of the morphogenetic proteins for about 4–6 weeks. The bone healing effects of BMP-2 gene transfer have been demonstrated in most experimental reports using rodents, but testing in big mammals such as dogs and sheep remains a challenge to probe the efficacy of BMP-2 in clinical gene therapy trials. Preliminary reports argue against the use of the adenoviral vectors. The route of vector administration may play an important role in the magnitude of the immune reaction, and the intraosseous administration probably decreases this response (Egermann *et al.*, 2006 b).

Our *in vitro* experiments performed in the DBM embedded with AdBMP-2-transduced MSCs at 1×10^4 MOIs showed the best transcription of ALP (a direct target of BMP-2 metabolic activity) at 48 h after transduction, whereas expression of type 1 collagen was not affected even 96 h after transduction. We observed a noticeable repopulation of the DBM scaffolds in the AdBMP-2-transduced MSCs, which was accompanied by increased mineralization of the extracellular matrix. These results suggest that sustained osteogenic activity extended for at least 10 days after transduction and agree with the

observation of previous reports (Hishikawa *et al.*, 2004; Luu *et al.*, 2007; Zachos *et al.*, 2007).

Given the possible induction effect of the DBM, we expected that a graft incorporating this material as support for the AdBMP-2-transduced MSCs should improve bone regeneration in a large mammal model, because other materials such as alginate counteract the bone induction once the transduced progenitor cells are implanted (Zachos *et al.*, 2007). The radiological follow-up showed that the 3C-graft implants in our dog model of mandible distraction reduced the healing time to almost half the normal consolidation period. The gross macroscopy, histology, and mechanical properties of the regenerated bone, 10 weeks after distraction, showed that the 3C-graft-reconstructed mature bone was of almost normal morphology and resistance. These features were not achieved in the non-transduced MSCs or with the standard distraction procedure in the same time. The induction of extensive fibrosis within the MSC-embedded matrix was a remarkable observation and argues against its use in bone regeneration in our model. Resistance to flexion reflects an increment in the mechanical integrity of the 3C-grafted bone. The stiffness test was not useful in this study because the regenerated bone displayed an elastic behavior in all groups affecting the measurement.

Engraftment of the genetically modified implant immediately after its assembling may synchronize the right times to trigger the genetic and metabolic mechanisms required to initiate and sustain the osteogenic activity.

Several other factors explored in our mongrel dog model argue in favor of the use of the 3C-graft in large mammals. This model uses immunocompetent animals with wide genetic heterogeneity and previous exposure to the non-laboratory environment. This is

supposed to be a challenge in preclinical research. It is also important to mention that the treated area is a subject of frequent and strong mechanical pressure in carnivores and, as the first portion of the digestive tract, is located in a zone of strong immunologic activity.

Histological examination did not show evidence of a relevant inflammatory reaction or lymphocytes in the implanted zones. We hypothesize that this may be explained either by the low immune exposure of the adenoviral vector and its transgenic protein by direct intraosseous administration, as claimed (Egermann *et al.*, 2006), or by the washing of non-replicative adenoviral remnants in the cultures and graft before the implantation. The use of autologous MSCs avoided graft rejection. Laboratory blood tests performed before and after implantation also argue in favor of the safety of this *ex vivo* approach.

In conclusion, the *in vitro* and *in vivo* tests showed the feasibility of regenerating normal bone tissue in the dog (a big mammal model), reducing the consolidation time to approximately half (6 weeks). The 3C-graft accelerated bone consolidation, restored normal bone tissue and architecture (as compared with surgeries without the graft or with non-transduced MSCs matrix grafts), and induced no noticeable inflammatory response in the treated area. These experiments also demonstrate that the therapeutic approach is safe, probably because the washing of vector excess in the implant before the grafting reduces the presentation of vector to the immune system.

Acknowledgment: This work was supported by the Support's Program for the Scientist and Technological Research of the UANL grant PAICYT-UANL SA684-02.

Author Disclosure Statement: No competing financial interests exist.

References

1. ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., HANKINS, G.R., BERES, E.J., ENGH, J.A., DAS, S., HUDSON S.B., KERNS K.M., KALLMES D.F., HELM G.A. (1999). In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* **10**, 2245–2253.
2. BALTZER, A.W., LATTERMANN, C., WHALEN, J.D., WOOLEY, P., WEISS, K., GRIMM, M., GHIVIZZANI S.C., ROBBINS P.D., EVANS C.H. (2000). Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* **7**, 734–739.
3. BETZ, O.B., BETZ, V.M., NAZARIAN, A., PILAPIL, C.G., VRAHAS, M. S., BOUXSEIN, M.L., GERSTENFELD L.C., EINHORN T.A., EVANS C.H. (2006). Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* **88**,355–365.
4. BLAIR, G.E. (2004). Adenoviral vectors: Adenoviral vectors, breaking a barrier to gene therapy? *Gene Ther.* **11**, 229–230.
5. BONSER, R.H. (1995). Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *J Exp Biol.* **198**, 209–212.
6. CAO, X., AND CHEN, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene.* **357**, 1–8.
7. CHEN, Y., LUK, K.D., CHEUNG, K.M., LU, W.W., AN, X.M., NG, S. LIN, M.C., KUNG, H.F. (2004). Combination of adeno-associated virus and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-2 produces enhanced

- osteogenic activity in immunocompetent rats. *Biochem Biophys Res Comm.* **317**, 675–381.
8. CHENG, H., JIANG, W., PHILLIPS, F.M., HAYDON, R.C., PEND, Y., ZHOU, L., LUU, H.H., AN, N., BREYER, B., VANICHAKARN, P., SZATKOWSKY, J.P., PARK, J.Y., HE, T.C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* **85-A**, 1544–1552.
9. COPE, J.B., SAMCHUKOV, M.L., CHERKASHIN, A.M. (1999). Mandibular distraction osteogenesis: a historic perspective and future directions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* **115**, 448–460.
10. EGERMANN, M., LILL, C. A., GRIESBECK, K., EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., SCHNEIDER, E., BALTZER A.W. (2006). Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther.* **13**, 1290–1299. (a)
11. EGERMANN, M., BALTZER A.W., ADAMASZEK, S., EVANS, C., ROBBINS, P., SCHNEIDER, E., LILL, C.A. (2006). Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther.* **17**, 507-17. (b)
12. EINHORN, T.A., MAJESKA, R.J. MOHAIDEEN, A., KAGEL, E.M., BOUXSEIN, M.L., TUREK, T.J., WOZNEY J.M. (2003). A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* **85-A**, 1425–1435.
13. GAISSMAIER, C., FRITZ, J., KRACKHARDT, T., FLESCH, I., AICHER, W. K., ASHAMMAKHI, N. (2005). Effect of human platelet supernatant on

proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*. **26**, 1953–1960.

14. GOVENDER, S., CSIMMA, C., GENANT, H.K., VALENTIN-OPRAN, A., AMIT, Y., ARBEL, R., ARO, H., ATAR, D., BISHAY, M., BÖRNER, M.G., CHIRON, P., CHOONG, P., CINATS, J., COURTENAY, B., FEIBEL, R., GEULETTE, B., GRAVEL, C., HAAS, N., RASCHKE, M., HAMMACHER, E., VAN DER VELDE, D., HARDY, P., HOLT, M., JOSTEN, C., KETTERL, R.L., LINDEQUE, B., LOB, G., MATHEVON, H., MCCOY, G., MARSH, D., MILLER, R., MUNTING, E., OEVRE, S., NORDSLETTEN, L., PATEL, A., POHL, A., RENNIE, W., REYNDERS, P., ROMMENS, P.M., RONDIA, J., ROSSOUW, W.C., DANEEL, P.J., RUFF, S., RÜTER, A., SANTAVIRTA, S., SCHILDHAUER, T.A., GEKLE, C., SCHNETTLER, R., SEGAL, D., SEILER, H., SNOWDOWNE, R.B., STAPERT, J., TAGLANG, G., VERDONK, R., VOGELS, L., WECKBACH, A., WENTZENSEN, A., WISNIEWSKI, T. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg Am.* **84-A**, 2123–2134.
15. HISHIKAWA, K., MIURA, S., MARUMO, T., YOSHIOKA, H., MORI, Y., TAKATO, T., FUJITA, T. (2004). Gene expression profile of human mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermoreversible gelation polymer. *Biochem Biophys Res Commun.* **317**, 1103–1107.

16. ILIZAROV, G.A., BERKO, V.G. (1980). Morphological characteristics of the regenerate formed during experimental femoral lengthening. *Orthop Traumatol Protez.* **7**, 54–59.
17. JANE, J.A., DUNFORD, B.A., KRON, A., PITTMAN, D.D., SASAKI, T., LI, J.Z., LI H., ALDEN T.D., DAYOUB H., HANKINS G.R., KALLMES D.F., HELM G.A. (2002). Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-6 gene transfer. *Mol Ther.* **6**, 464–470.
18. KÖSE, G.T., KORKUSUZ, F., OZKUL, A., SOYSAL, Y., OZDEMIR, T., YILDIZ, C., HASIRCI, V. (2005). Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials.* **26** (25), 5187–5197.
19. LOUIS-UGBO, J., MURAKAMI, H., KIM, H.S., MINAMIDE, A., BODEN, S.D. (2004). Evidence of osteoinduction by Grafton demineralized bone matrix in nonhuman primate spinal fusion. *Spine.* **29**, 360–366.
20. LUU, H.H., SONG, W.X., MANNING, D., LUO, J., DENG, Z.L., SHARFF, K. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* **25**, 665–77.
21. OKUBO, Y., BESSHO, K., FUJIMURA, K., IIZUKA, T., MIYATAKE, S.I. (2000). Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. *Biochem Biophys Res Commun.* **267**, 382–387.
22. OREFFO, R.O., COOPER, C., MASON, C., CLEMENTS, M. (2005). Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* **1**, 169–178.

23. PEISTER, A., MELLAD, J.A., LARSON, B.L., HALL, B.M., GIBSON, L.F., PROCKOP, D.J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. **103**, 1662–1668.
24. PETERSON, B., WHANG, P.G., IGLESIAS, R., WANG, J.C., LIEBERMAN, J.R. (2004). Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am*. **86-A**, 2243–2250.
25. SNYDER, C.C., LEVINE, G.A., SWANSON, H.M., BROWNE, E.Z. (1973). Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg*. **51**, 506–508.
26. URIST, M.R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*. **150**, 893-899.
27. VALENTIN-OPRAN, A., WOZNEY, J., CSIMMA, C., LILLY, L., RIEDEL, G.E. (2002). Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res*. **395**, 110–120.
28. VARADY, P., LI, J.Z., CUNNINGHAM, M., BERES, E.J., DAS, S., ENGH, J., ALDEN, T.D., PITTMAN, D.D., KERNS, K.M., KALLMES, D.F., HELM, G.A. (2001). Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. *Hum Gene Ther*. **12**, 697–710.
29. ZACHOS, T., DIGGS, A., WEISBRODE, S., BARTLETT, J., BERTONE, A. (2007). Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. *Mol Ther*. **15**, 1543–1550.

Table 1. Blood tests for toxicity

Test	Before surgery	2 weeks after surgery
PT (g/dl)	6.63 ± 0.5	6.166 ± 0.23
ALB (g/dl)	2.83 ± 0.57	2.533 ± 0.32
GLOB (g/dl)	3.8 ± 0.55	3.633 ± 0.32
TB (mg/dl)	0.099 ± 1.67x10 ⁻¹⁷	0.099 ± 1.67x10 ⁻¹⁷
AST (IU/L)	33 ± 12.52	24 ± 4.35
ALT (IU/L)	58.33 ± 31.89	43.33 ± 35.72
ALP (IU/L)	60.66 ± 13.27	67.33 ± 38.03
LDH (IU/L)	419.33 ± 40.96	298.66 ± 84
GGT (IU/L)	4.9 ± 3.1	0.1 ± 1.67 × 10 ⁻¹⁷

PT, prothrombin time; ALB, albumin; GLOB, globulin; TB, total bilirubin (TB); AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactic dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

Table 2. Flexion test

Sample	No distraction	Group I	Group II	Group III
σ_{\max} (MPa)	163.09 ± 30.81	41.225 ± 3.581	25.34	6.46

σ_{\max} , maximum flexion stress; Group I, 3C-graft; group II, non-transduced MSC graft; group III, no graft.

Figure Legends

Figure 1. Biological activity of transduced hBMP-2 in dog's MSCs. (A) The transcriptional activity of the ALP gene (a target of BMP-2) in cultured MSCs reached a peak 48 h after transduction with different doses of the AdBMP-2 vector. Transduction at an MOI of 10^4 showed significantly higher activity ($p = 0.001$). (B) Western blot analysis of the hBMP-2 showed that protein production did not differ from the positive control 96 h after transduction. (C) Western blot analysis of the canine type 1 collagen in transduced MSCs.

Figure 2. *In vitro* bone regeneration 10 days after transduction (150× magnification). H&E and Gomori stains showed MSC integration into the DBM and collagen production in all cases with a remarkable overpopulation of MSCs in the 3C-graft; von Kossa staining demonstrates increased calcification of the AdBMP-2-transduced graft; the brown areas reveal calcium deposits.

Figure 3. *In vivo* assays. (A) Radiographic follow-up in the sixth week of bone consolidation. Yellow triangles mark the consolidation progress in control mandible, and red triangles mark the osteotomy edges of the consolidated 3C-graft-treated mandible. (B) Post-mortem mandible (distracted areas are circled in red). The non-engrafted mandible shows normal bone contraction in the distracted area with notable indentations. The mandible treated with the non-transduced graft shows an extensive area of fibrosis. The 3C-grafted bone shows complete ossification without fibrosis. (C) Masson-stained biopsy of distracted bones. The non-engrafted mandible shows widespread immature osteoblastic activity. The mandible with the non-transduced graft contains zones of fibrosis intercalated with newly formed cores. The 3C-graft-treated mandible demonstrates improved bone remodeling (lamellar and spongy bone structures) with less fibrosis.

Figure 1

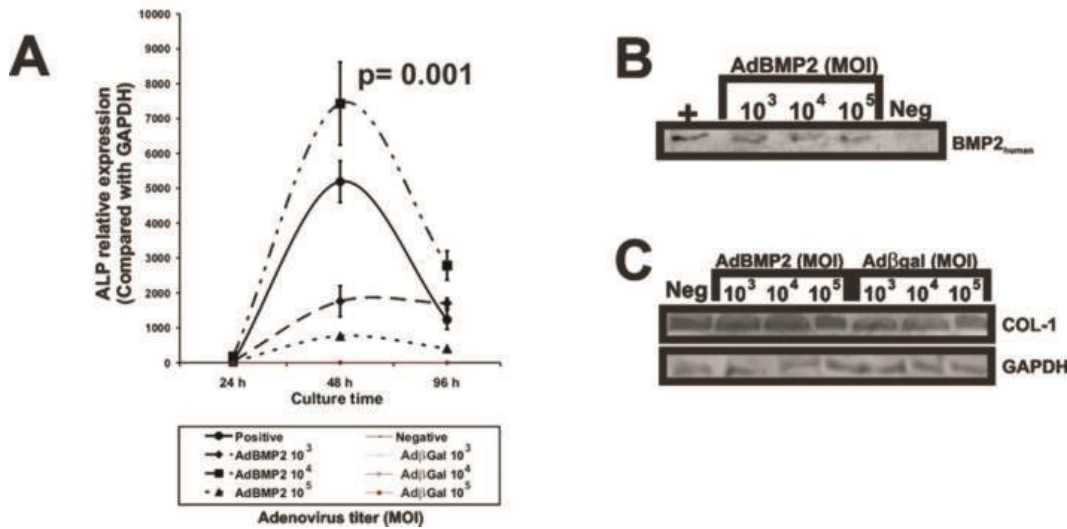


Figure 2

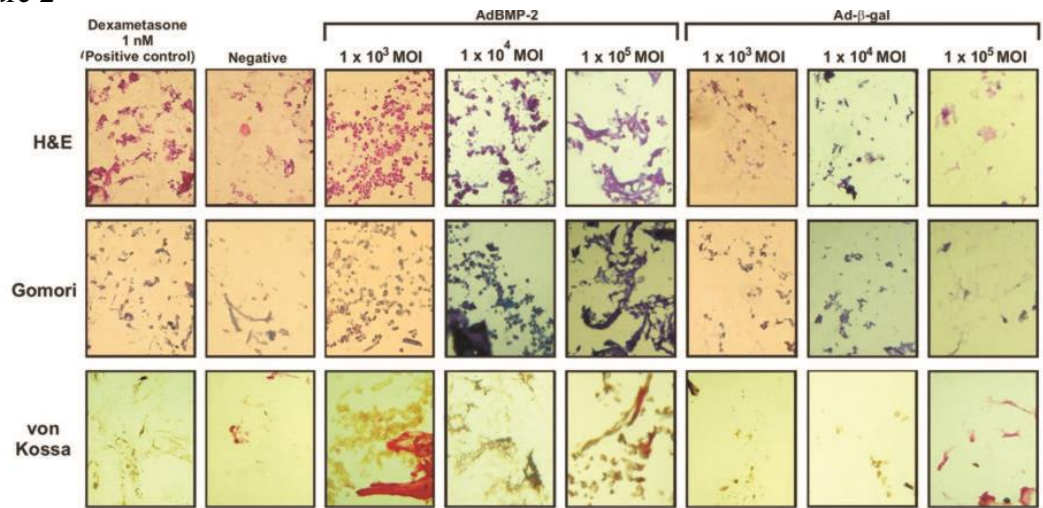


Figure 3

